

УДК 615.014:615.454:615.322:633.791

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ ИНТРАВАГИНАЛЬНЫХ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ КОЛЛАГЕНОВЫХ ПЛАСТИН С ЭКСТРАКТОМ ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО

©2013 Г.В. Аюпова, Е.Д. Батырова

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Поступила 17.06.2013

В статье представлены результаты исследования способа экстрагирования соплодий хмеля, изучения совместимости экстракта хмеля с раствором коллагена, установлено их оптимальное соотношение. Установлен режим сублимационного высушивания этой композиции. Определены влажность и растворимость интравагинальных коллагеновых пластин.

Ключевые слова: средства вагинального применения, способ экстрагирования, хмель обыкновенный, коллаген, режим сублимационного высушивания, коллагеновые пластины.

Исследования в области создания композиций для интравагинального применения являются перспективными ввиду того, что широко распространенные инфекционно-воспалительные заболевания женской половой сферы влияют на репродуктивную функцию женщины, уровень рождаемости и здоровье нации в целом [1, 7]. Традиционная антибактериальная монотерапия таких заболеваний эффективна только отчасти, сопровождается побочными реакциями и сокращает сроки их ремиссии. В связи с этим необходим многоэтапный и комплексный подход к решению таких проблем [6, 8]. Хмель обыкновенный, известное в пищевой и фармацевтической промышленности растение, богат биологически активными веществами разных химических классов и обладает удачным сочетанием фармакологических свойств (седативное, нейротропное, противовоспалительное, противоязвенное, капилляроукрепляющее, антиоксидантное, болеутоляющее, снотворное антимикробное, желчегонное, фитоэстрогены) [4, 11]. Для создания средств вагинального применения наиболее предпочтительными соединениями соплодий хмеля обыкновенного являются полифенольные соединения (флавоноиды, содержание которых в пересчете на рутин не менее 0,3%, антоцианидины, катехины и фенолкарбоновые кислоты), горечи хмеля (содержание суммы производных ацилфлороглюцидов в пересчете на гумулон, лупулон, гулупон составляет не менее 10,0%) и фитоэстрогены (производные 8-пренилнارينгина) [4, 5, 11].

С точки зрения фармацевтической технологии среди гинекологических лекарственных форм представляют интерес интравагинальные биодegradуемые коллагеновые пластины (БКП). Это связано с их ценными экономическими и технологическими свойствами. БКП отличаются простотой состава и технологии, не требуют сложного технологического оборудования при изготовлении, стабильны в процессе хранения, обладают

адгезионными свойствами к слизистой, поглощают избыточное содержание влаги и что, особенно важно, полностью растворяются во влагалищной жидкости и выводятся естественным путем, без дополнительных промываний и спринцеваний. БКП имеют индивидуальную упаковку, компактны, просты и удобны в применении, что повышает их потребительские свойства и способствует росту их доли на фармацевтическом рынке. БКП обладают осмотической активностью и имеют биофармацевтические преимущества, в частности высокую биодоступность, связанную со значительной биоадгезией. Также это дает возможность пролонгирования действия биологически активных веществ (БАВ) [2].

В последнее время все больший интерес представляют разработки лекарственных форм на основе коллагена. Перспективным для применения в гинекологической практике является уксуснокислый раствор коллагена [3]. Это связано с его природным происхождением, высокой загущающей и набухающей способностью, а также кислой средой, которая способствует поддержанию нормального pH в месте воспаления, восстановлению метаболических процессов, замедлению деятельности микроорганизмов и созданию благоприятной среды для развития нормофлоры. В связи с этим, актуальным является обоснование составов БКП с экстрактом соплодий хмеля обыкновенного не только с технологической, но и медицинской точки зрения [5].

Целью настоящего исследования явилось обоснование технологии интравагинальных биодegradуемых коллагеновых пластин с экстрактом хмеля обыкновенного.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве лекарственного растительного сырья были использованы соплодия хмеля обыкновенного, произрастающего на территории Республики Башкортостан. Сырье было собрано и высушено в соответствии с требованиями ГФ XII.

В основе технологии получения всех фитопрепаратов находится процесс экстрагирования суммы

Аюпова Гульнара Вазыховна, к.фарм.н., доцент, e-mail: Ayupova2007@mail.ru; Батырова Елена Даригатовна, соискатель

БАВ из растительного сырья. Как возможные экстрагенты нами были использованы вода очищенная и спирт этиловый концентрации 40%, 50%, 70%, 90%.

При определении основных параметров экстрагирования (вид экстрагента, степень измельчения, время настаивания, модуль экстракции, способ экстрагирования) качество полученных извлечений из сырья хмеля обыкновенного оценивали по критерию – количественное содержание суммы флавоноидов и суммы ацилфлороглюцидов (АФГ) методом спектрофотометрии в пересчете на рутин и титриметрическим методом, соответственно [9,10].

Совместимость полученных экстрактов хмеля с 2% раствором уксуснокислого раствора коллагена изучали известным методом центрифугирования при 3000 об/мин в течение 5 мин после выдерживания образцов в течение 24 час при различных температурах: $20\pm 2^\circ\text{C}$, $5\pm 2^\circ\text{C}$, $40\pm 2^\circ\text{C}$, которые возможны в рамках технологических процессов на производстве и медицинского применения. Стабильность композиций оценивали по отсутствию расслаивания.

Режим замораживания и сублимации полученных стабильных композиций экстракта хмеля с раствором уксуснокислого раствора коллагена отработывали на сублимационной установке ТГ-50. Для оптимизации процесса проводили определение эвтектических зон методом электропроводности.

Такие технологические показатели коллагеновых пластин с экстрактом хмеля, как потеря в массе при высушивании и растворимость, определяли по методикам ГФ XII издания.

Одним из важнейших факторов экстракции, влияющих на скорость и полноту извлечения действующих веществ, является подбор оптимального экстрагента. Такие технологические характеристики исследуемых образцов соплодий хмеля обыкновенного, как фракционный состав, насыпная масса угол естественного откоса, степень набухания сырья в воде и этаноле 70%, а также коэффициенты поглощения воды и этанола 70%, были определены нами ранее [9, 10]. Они необходимы для выбора оптимального способа экстрагирования, расчета количества сырья и экстрагента.

Таблица 1. Влияние степени измельчения сырья хмеля обыкновенного на выход суммы флавоноидов, в пересчете на рутин (в %), и суммы АФГ в извлечениях

Номера сит	Степень измельчения, мм	Выход суммы флавоноидов (по рутину)	Выход суммы АФГ
№ 1	< 1	0,03±0,126	16,8±0,427
№ 2	1- 2	0,79±0,117	16,5±0,495
№ 3	2- 3	1,61±0,122	14,3±0,552
№ 4	3- 4	1,40±0,110	13,0±0,541
№ 5	4- 5	1,22±0,112	11,3±0,539
№ 6	5- 6	0,54±0,120	10,7±0,523

Экспериментально было установлено, что при экстрагировании соплодий, время наступления равновесия в системе сырье-экстрагент наступает в

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Комплекс биологически активных веществ соплодий хмеля обыкновенного представлен, в основном, полифенольными соединениями и органическими кислотами, поэтому необходим такой экстрагент, который максимально полно растворяет и извлекает обе группы веществ. Таким оптимальным растворителем как для суммы флавоноидов, так и для органических кислот является этиловый спирт. Однако для группы флавоноидов, имеющих более трех гликозидных остатков, наилучшим экстрагентом является вода.

Экстрагирование соплодий хмеля обыкновенного различными экстрагентами, а именно спиртом этиловым различной концентрации (40%, 50%, 70%, 90%), проводили из навесок одной и той же серии сырья, при одинаковых условиях, соотношение сырье-экстрагент 1:10, учитывая при этом степень измельчения сырья, от которой будет зависеть площадь поверхности соприкосновения фаз и процесс массопереноса биологически-активных веществ.

Параметрами определения эффективности экстракции служили выход суммы флавоноидов, который определялся методом спектрофотометрии, и выход суммы ацилфлороглюцидов, количественное определение которых проводилось титриметрическим методом. Как видно из результатов, представленных в таблице 1, максимальное содержание суммы флавоноидов по рутину в соплодиях хмеля обыкновенного было выявлено в извлечениях на 70% этаноле, из сырья с размером частиц 2-5 мм, а суммы АФГ – в извлечениях из соплодий с размером частиц 1-2 мм и менее. Это связано с тем, что основное содержание горьких кислот в соплодиях хмеля сконцентрировано в их железках, имеющих размер 0,5-1мм. При просеивании наибольшее количество железок обнаруживается в самой мелкой фракции сырья. В связи с этим, с целью получения максимального выхода всех действующих веществ, для экстрагирования соплодий хмеля обыкновенного нами было выбрано сырье с размером частиц менее 4 мм.

промежутке 18-24 час. Дальнейшее экстрагирование нецелесообразно. Необоснованное увеличение времени экстрагирования приводит к излишним

энерго- и трудозатратам, способствует переходу в вытяжку излишних количеств балластных веществ.

Из возможных способов экстрагирования сырья хмеля обыкновенного нами были выбраны методы бисмацерации, перколяции и реперколяции.

Бисмацерацию проводили в два этапа: на первом этапе сырье заливали семью частями экстрагента, настаивали в течение 10 час при периодическом помешивании, полученную вытяжку сливали, а отжатое сырье заливали оставшимися тремя частями экстрагента. Общее время настаивания составляло 14 час. По истечении времени настаивания сырье отжимали, вытяжки объединяли, отстаивали 3 сут в холодильнике для осаждения балластных веществ и фильтровали. При данном методе во всех вытяжках наблюдался значительный осадок, практически полностью удаляемый фильтрованием.

Для проведения перколяции навеску сырья хмеля замачивали в небольшом количестве экстрагента

на 30 мин, набухшее сырье забивали в перколятор, заливали частью экстрагента «до зеркала» и настаивали в течение 24 час. По истечении времени перколировали с рассчитанной скоростью оставшимся количеством экстрагента. Полученные перколяты отстаивали в холодильнике, фильтровали.

Процесс реперколяции проводили с завершённым циклом, используя батарею из трех перколяторов. Навеску сырья делили на три равные части, первую часть замачивали, заливали «до зеркала», настаивали в течение 24 час и перколировали чистым экстрагентом; для второй, третьей части сырья экстрагентом служила вытяжка из предыдущего перколятора по той же схеме.

Модуль экстракции для методов бисмацерации был выбран 1:10, 1:5, 1:2, для перколяции 1:10, 1:5, 1:2; для реперколяции – 1:5, 1:2. Результаты проведенных исследований приведены в таблице 2.

Таблица 2. Влияние выбора метода экстрагирования и модуля экстракции на выход суммы флавоноидов (по рутину) и суммы АФГ из соплодий хмеля обыкновенного

№ п/п	Метод экстрагирования	Модуль экстракции	Время экстракции	Выход суммы флавоноидов	Выход суммы АФГ
1	Бисмацерация	1:10	14 ч	1,40±0,122	16,8±0,591
		1:5	14 ч	0,60±0,132	12,4±0,589
		1:2	14 ч	1,92±0,095	13,2±0,487
2	Перколяция	1:10	28 ч	1,05±0,129	14,4±0,381
		1:5	28 ч	3,38±0,117	13,3±0,425
		1:2	28 ч	1,92±0,142	13,2±0,473
3	Реперколяция	1:5	76 ч	1,31±0,134	9,6±0,483
		1:2	76 ч	3,17±0,123	13,4±0,618

Таким образом, были определены оптимальные условия получения экстракта соплодий хмеля обыкновенного для получения интравaginaльных биодegradируемых коллагеновых пластин: экстрагент – 70% этанол, размер частиц сырья соплодий хмеля обыкновенного – 2-4 мм, метод экстрагирования – перколяция, модуль экстракции – 1:5 и время настаивания – 24 час.

Для получения качественного готового продукта необходимо, чтобы в течение всего технологического процесса композиции УРК с экстрактом хмеля обыкновенного были стабильными с химической и физической точек зрения. Исследуемые составы до стадии сублимационного высушивания имеют гелеобразную консистенцию. Гели являются структурированными системами, стабильность которых зависит от многих факторов, в частности, от температуры и механических воздействий. Введение экстракта хмеля обыкновенного в гель УРК может повлиять на физическую стабильность композиции. В таблице 3 представлены результаты исследований стабильности композиций в зависимости от соотношения компонентов и концентрации этанола в исследуемых экстрактах методом центрифугирования.

Как видно из таблицы 3, изученные составы до сублимационной сушки обладают агрегативной устойчивостью как после приготовления, так и после 24 час хранения в различных условиях в случае использования экстракта хмеля на 50% этаноле. На основании чего, можно сделать вывод о технологической совместимости компонентов и стабильности. После замораживания и сублимационного высушивания экспериментально было установлено оптимальное соотношение 1:1 формообразующего компонента – УРК и действующего начала – экстракта хмеля на 50% этаноле. При соотношении компонентов в сторону увеличения формообразователя – коллагена (2:1) масса теряет эластичность, снижение (1:2) коллагена в составе приводит к потере пористости и эластичности пластин.

Для получения однородной массы УРК с экстрактом хмеля обыкновенного тщательно перемешивали их в гомогенизаторе при скорости вращения лопастей мешалки до 2000 об/мин в течение 3 мин. Полностью однородный состав композиции разливали по кюветам размером 54×36 см с толщиной слоя 7-9 мм, равномерно распределяя по всей площади кюветы.

Таблица 3. Стабильность композиций УРК с экстрактом хмеля (ЭХ)

Составы, соотношение по массе	Внешний вид коллагеновых пластин после сублимационной сушки	Агрегативная устойчивость гелей после центрифугирования 3000 об/мин в течение 5 мин (n=5)			
		После приготовления	После 24 час хранения		
			+20±2°C	+40±2°C	+5±2°C
УРК+ЭХ (50%) 1:1	Пористая эластичная пластина 4-5 мм коричневатого цвета	0	0	0	0
УРК+ЭХ (50%) 1:2	Тонкая непористая пленка коричневатого цвета 1-3 мм	0	0	0	0
УРК+ЭХ (50%) 2:1	Хрупкая, рассыпчатая масса коричневатого цвета	0	0	0	0
УРК+ЭХ (70%) 1:1	Пористая эластичная пластина 4-5 мм коричневатого цвета	0	0	Расслоение	0
УРК+ЭХ (70%) 1:2	Тонкая непористая пленка коричневатого цвета 1-3 мм	0	Расслоение	Расслоение	0
УРК+ЭХ (70%) 2:1	Хрупкая, рассыпчатая масса коричневатого цвета	0	0	Расслоение	0

Прим. «0» - композиция не расслоилась, стабильная

Полученные однородные композиции коллагена с экстрактом хмеля 1:1 подвергали сублимационному высушиванию. Режим замораживания и сублимации отработывали на сублимационной установке ТГ-50. Для оптимизации процесса проводили определение эвтектических зон методом электропроводности. Измерение сопротивления при замораживании и оттаивании композиции выявило эвтектическую зону в области температур от 0°C до -10°C. Таким образом была определена пороговая температура, превышение которой в период собственно сублимации могло бы привести к коллапсу материала.

Режим сушки коллагеновой смеси с экстрактом хмеля проводили при полной загрузке камеры. После заморозки до -20°C камеру вакуумировали до равновесной рабочей давлению 16 Па (-40°C). Далее устанавливали стандартное течение процесса, периода собственной сублимации. На 16 часу сушки был отмечен температурный скачок, означаю-

щий окончание возгонки свободной воды, после чего происходило удаление связанной воды. Коллагеновые пластины досушивали еще в течение 9±2 час. Показания вакуума колебались в пределах 16-17,7 Па. Влажность конечного продукта находилась в прямой зависимости от длительности процесса. При продолжительном высушивании 33±3 час остаточная влажность составила 7-12%, что удовлетворяло требованиям, предъявляемым к готовому препарату. После выгрузки из камеры готовые пластины выгружают и нарезают размером 50×50 мм, герметично упаковывают в полимерные пакеты, после чего коллагеновые пластины стерилизуют радиационным облучением.

Для дальнейшей разработки показателей качества БКП с экстрактом хмеля были определены некоторые физико-химические свойства в соответствии с требованиями ГФ XII издания: потеря в массе при высушивании, растворимость и рН водной вытяжки, которые представлены в таблице 4.

Таблица 4. Органолептические и физико-химические свойства БКП с экстрактом хмеля

№ п/п	Свойства	Параметры
1	Внешний вид	высокопористая губка коричневатого цвета со специфическим запахом квадратной формы с ровными боковыми срезами
2	Потеря в массе при высушивании, %	до 14%
3	рН водной вытяжки	4,2-5,2
4	Растворимость	не более 20 мин при температуре 37±2°C
5	Размер, мм	длина-50±2-, ширина -50±2, высота-5 ±2

Создание такого средства вагинального применения для профилактики и лечения воспалительных заболеваний женских урогениталиев в форме БКП позволяет одновременно решать комплекс возникающих проблем (нарушение адекватной кислотности влагалищной среды, ослабление местно-

го иммунитета, гипоестрогенения и нарушение баланса влагалищной экосистемы в сторону условно-патогенных организмов, сопровождающееся увеличением влагалищной жидкости) благодаря сочетанию экстракта соплодий хмеля обыкновенного и уксуснокислого раствора коллагена (УРК).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Головкин В.А., Головкин В.В., Головкин А.В. Вагинальные лекарственные средства: Особенности разработки, исследования и применения. Запорожье: РИП «Видавель», 2000. 271 с.
2. Мизина П.Г., Быков В.А. Чрескожное введение лекарственных средств: современные аппликационные формы: Учебное пособие. Самара: СамГМУ. 2004. 124 с.
3. Истранов Л.П., Абоянц Р.К., Истранова Е.В. Местные гемостатические средства на основе коллагена // ФАР-Миндекс-Практик. СПб. 2006. Вып. 10. С. 56-59.
4. Радзинский В.Е., Михайленко Е.Т., Захаров К.А. Лекарственные растения в акушерстве и гинекологии. 6-е изд. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005. 320 с.
5. Уланова В.А., Гладченко О.М. Влияние суппозиториев шишек хмеля на течение экспериментального вульвовагинита у крыс самок // Запорожский медицинский журнал. 2008. № 4 (49). С. 49-54.
6. Бадретдинова Ф.Ф., Ахметгалиева М.А., Нуртдинов М.А. Комплексная терапия бактериального вагиноза // Медицинский вестник Башкортостана. 2008. Т. 3. № 2. С. 28-31.
7. Кира Е.Ф. Бактериальный вагиноз. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2012. 472 с.
8. Патент № 2325148 РФ / Аюпова Г.В., Федотова А.А., Давлетшина Р.Я., Лиходед В.А. и др. // Средство для лечения бактериального вагиноза. Уфа. 2008. 2 с.
9. Латыпова Г.М., Аюпова Г.В. и др. Исследования по содержанию горьких кислот сырья хмеля обыкновенного // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация. 2012. № 10 (129). Вып. 18/2. С. 65-69.
10. Аюпова Г.В. Исследование факторов, влияющих на процесс экстрагирования соплодий хмеля обыкновенного // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация. 2012. № 10 (129). Вып. 18/3. С. 54-60.
11. Srinivasan V., Goldberg D., Haas G. Contributions to the antimicrobial spectrum of Hop constituents // Economic Botany. 2004. V. 58. P. 230-238.

TECHNOLOGICAL ASPECTS OF DEVELOPING INTRAVAGINAL BIODEGRADABLE COMPOSITIONS BASED ON COLLAGEN AND CONTAINING EXTRACT OF *HUMULUS LUPULUS*

©2013 G.V. Ayupova, E.D. Batyrova

Bashkir State Medical University, Ufa

The paper presents the results of the study of extraction method of *Humulus lupulus* infructescence and the study of compatibility of *Humulus lupulus* extract with collagen solution and their optimal ratio. The regime for sublimation drying of this composition has been determined. Such characteristics as moisture and solubility of intravaginal collagen based compositions have been established.

Keywords: means for vaginal use, extraction method, *Humulus lupulus*, collagen, regime for sublimation drying, collagen compositions.