

ТЕХНОЛОГІЯ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

Рекомендована д.ф.н., професором С.О. Тихоновою

УДК 615.015.032:615.454.1.014.22:616-08-031.84:616.5-001.1

ПЕРСПЕКТИВИ СТВОРЕННЯ ГОМЕОПАТИЧНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ У ФОРМІ МАЗІ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ АЛЕРГІЧНИХ ДЕРМАТИТІВ

О.І.Тихонов, Н.А.Чорна, О.А.Красільникова

Національний фармацевтичний університет

Опрацьовані літературні дані за станом захворювань на алергічні дерматити в Україні. Вивчені фармакологічні властивості отрути бджолиної як субстанції для створення дерматологічної мазі. Наведені результати досліджень технологічного та фізико-хімічного аналізу отрути бджолиної. Визначені показники активності фосфоліпази А та глюкозамінглікангідролазного комплексу. Отримані результати можуть бути покладені в основу при розробці аналітичної нормативної документації для вхідного контролю на субстанцію.

На теперішній час проблема лікування алергічних дерматитів набуває все більш актуального значення для сучасної медицини і фармації. Спираючись на літературні дані Українського республіканського центру медичної статистики, можна спостерігати тенденцію до збільшення захворюваності на алергічні дерматити у різних регіонах країни незалежно від вікової категорії населення (рис.) [1].

Незважаючи на те, що фармацевтичний ринок представлений значною кількістю лікарських засобів для лікування вказаної патології, далеко не у всіх випадках вдається досягти стійкої фармакологічної дії та ефективної фармакотерапії хворих [1, 16].

Враховуючи наявність субстанцій природного походження та арсенал лікарських препаратів, розроблених на їх основі, які представлені на фармацевтичному ринку Україні, проблема лікування алергічних дерматитів є відкритою і потребує нових сучасних підходів. Згідно з літературними джерелами для лікування даної патології існує значна база стандартизованих біологічно активних субстанцій продуктів бджільництва [6, 17].

Але на наш погляд, найбільш перспективною сировиною у створенні високоефективних апіпрепаратів для використання при дерматологічних захворюваннях є отрута бджолина. Тому метою

нашої роботи стало вивчення даної субстанції для подальшої розробки гомеопатичного препарату у формі мазі для лікування алергічних дерматитів.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- проаналізувати та узагальнити сучасні літературні дані щодо створення лікарських препаратів для лікування алергічних дерматитів;
- провести технологічні та фізико-хімічні дослідження отрути бджолиної;
- вивчити якісний та кількісний вміст біологічно активних речовин в отруті бджолиній;
- розробити методики аналізу проекту АНД для вхідного контролю субстанції отрути бджолиної.

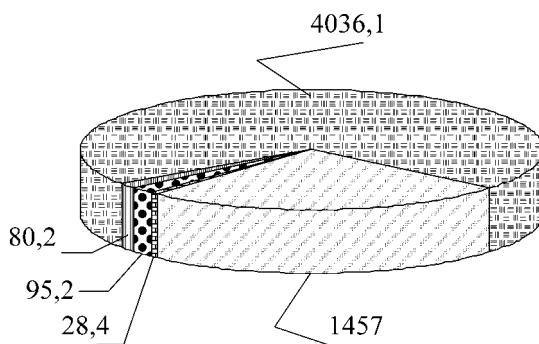
Експериментальна частина

Об'єктом дослідження була отрута бджолина, олія горіха волоського (ТУ У 15.8-24333456-0032003), гліцерин (ч.д.а.), гліцерин 85%, спирт етиловий 70%, спирт етиловий 95%, вода очищена, ацетон, розчинник спирт-вода-гліцерин (6:3:1).

Отрута бджолина в гомеопатії відома під на-звою "Апізин" і була внесена до номенклатури гомеопатичних препаратів України [7]. Основні вимоги до якості отрути бджолиної наведені у табл. 1.

З метою раціонального введення отрути бджолиної в лікарські форми нами також була вивчена розчинність даної субстанції у різних розчинниках [2, 3]. Для цього розчиняли 0,1 г отрути бджолиної (при нормальнih умовах) у спирті етиловому 70%, спирті етиловому 95%, воді очищеної, ацетоні, гліцерині (ч.д.а.) (1:100), гліцерині 85% (1:100), олії горіха волоського (1:100) та у розчиннику спирт-вода-гліцерин (6:3:1) (1:100). Одержані дані представлені у табл. 2.

Як видно з наведених даних табл. 2, отрута бджолина помірно розчинна у гліцерині (ч.д.а.), гліцерині 85%, олії горіха волоського та у розчиннику спирт-гліцерин-вода (6:3:1). Це дає нам змо-



- Інфекції шкіри і підшкірної жирової клітковини (1457)
- Дерматофітози (28,4)
- Мікози стоп (95,2)
- Сверблячка (80,2)
- Всього захворювань шкіри і підшкірної жирової клітковини (4036,1)

Рис. Доля інфекційні та паразитарні захворювання шкіри (кількість на 100 тис. населення) в Україні.

гу запропонувати ввести до складу мазі отруту бджолину шляхом розчинення в одному з запропонованих розчинниках [2, 16-18].

Згідно з літературними даними до складу олії горіха волоського входять: ненасичені жирні кислоти (лінолева, ліноленова, вітамін Р), вітаміни А, Е, каротиноїди, група вітамінів В, макро- і мікроелементи (цинк, мідь, йод, кальцій, магній, залізо, фосфор, кобальт), біологічно активні речовини. В олії волоського горіха міститься значна кількість вітаміну Е. Володіючи протизапальними властивостями, олія горіха волоського з успіхом застосовується при лікуванні запальних захворювань шкіри і слизових оболонок, сприяє загоєнню ран, тріщин, задавнених виразок. Вона ефективна при лікуванні дерматологічних захворювань шкіри

(псоріазу, екземи, фурункульозу). У косметології олія горіха волоського використовується для пом'якшення сухої шкіри. Будучи активними антиоксидантами, вітаміни, що знаходяться в олії, уповільнюють процеси старіння організму, стимулюють процеси кровотворення [6].

Враховуючи літературні дані, можна зробити висновок, що олія горіха волоського може використовуватись не тільки як розчинник, але і здатна потенціювати дію отрути бджолиної у складі гомеопатичної мазі при лікуванні алергічних дерматитів.

Якісний склад

Якісний аналіз основних груп біологічно активних речовин отрути бджолиної визначали за допомогою кольорових та осадових реакцій.

Таблиця 1

Основні показники якості отрути бджолиної

Найменування показника	Значення
Зовнішній вигляд	Порошок у вигляді дрібних крупинок та лусок
Колір	Білий з кремуватим відтінком чи з жовтизною
Консистенція	Порошкоподібна
Органолептичні властивості	Викликає подразнення слизової оболонки, чхання
Вагова частина нерозчинних у воді домішок, %, не більше	5
Вагова частина води, %, не більше	8
Вагова частина сирої золи, %, не більше	2
Активність фосфоліпази А в 1 мг отрути у перерахунку на суху вагу, МО, не менше	100
Активність глюкозамінглікангідролазного комплексу (ГАГГ) в 1 мг, у перерахунку на суху вагу, МО, не менше	70
Визначення часу гемолізу, %, не менше	100
Вагова частина мелітину, %, не менше	50
Вагова частина апаміну, %, не менше	2

Таблиця 2
Розчинність отрути бджолиної
у різних розчинниках

Розчинник	Дані про розчинність отрути бджолиної
Вода очищена	Практично нерозчинна
Гліцерин (ч.д.а.)	Помірно розчинна (1,0-100 мл)
Гліцерин 85%	Помірно розчинна (1,0-100 мл)
Спирт етиловий 70%	Нерозчинна
Спирт етиловий 95%	Нерозчинна
Ацетон	Нерозчинна
Олія горіха волоського	Помірно розчинна (1,0-100 мл)
Спирт-вода-гліцерин (6:3:1)	Помірно розчинна (1,0-100 мл)

Для виявлення амінокислот проводили реакцію з нінгідрином, запропоновану Німецькою гомеопатичною фармакопеєю та французькою фармакопеєю для ідентифікації препаратів "Апі" (синьо-фіолетове забарвлення, що свідчить про наявність амінокислот). Реакція з 10% розчином таніну. Має з'явитися каламуть, при стоянні випадає осад (білки). Реакція з тимолом. Має спостерігатися червоне забарвлення (цукри). Реакція з резорцином у концентрованій кислоті сірчаній. Має з'явитися жовтий розчин з рожевим осадом (кислота глутамінова, фруктоза, сахароза). Реакція з резорцином у солянокислому середовищі. Характерне жовто-буре забарвлення (фруктоза, глукоза). Для дослідження осадових реакцій азотовмісних сполук отрути бджолиної використовували 1% розчин калію перманганату, 0,5% розчин кислоти пікринової, реактиви Бушарда, Зонненштейна (розчин кислоти фосфорномолібденової), Шейблера (розчин кислоти фосфорновольфрамової) [12].

Кількісний склад

Хімічний склад отрути бджолиної дуже складний і до кінця не вивчений. У своєму складі вона містить ферменти — фосфоліпазу А, гіалуронідазу, фосфотазу, альфа-глюкозидазу, бета-галактозидазу і поліпептиди — мелітин, апамін, МСД-пептид, протеазні інгібітори і ряд інших біологічно активних компонентів, вміст яких наближено до доз, близьких до гомеопатичних [8-19].

Серед ферментів найбільше практичне значення мають глюкозаміноглікангідролазний комплекс

Таблиця 3

Активність фосфоліпази А
та глюкозаміноглікангідролазного комплексу
отрути бджолиної ($M \pm m$, $n=5$).

Активність фосфоліпази А (не менше 100), МО	$139,60 \pm 6,92$
Активність ГАГГ комплексу (не менше 70), МО	$74,54 \pm 2,80$

(ГАГГ) та фосфоліпаза А. Активність ферменту фосфоліпази А оцінювалася за мірою гідролізу лецитину та вивільненням кислоти жирної [9, 12, 17]. Для цього у три пробірки з притертими пробками місткістю 20 мл поміщають по 1 мл розчину препарату (0,01 г (т.н.) отрути бджолиної розчиняють у 10 мл води), 1 мл реактиву I (примітка 2) і 1 мл 10% розчину L — альфа-лецитину у спирті етиловому 95%. Пробірки закривають пробками, струшують протягом 30 с за секундоміром і витримують у термостаті при температурі $(37 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ протягом 30 хв (за секундоміром). Потім у всі пробірки додають по 7 мл екстракційної суміші (примітка 3), енергійно збовтують протягом 3 хв і витримують при температурі 20°C протягом 1 години до повного розділення фаз. По 3 мл розчину верхнього шару з кожної пробірки поміщають у конічні колби місткістю 25 мл, додають по 5 крапель 0,2% розчину тимолового синього у 95% спирті і титрують в умовах, які виключають дію вуглекислого газу, з мікробюретки 0,01 М розчином калію гідроксиду в ізопропіловому спирті до переходу жовтого забарвлення у синє, яке не зникає протягом 30 с [2, 3].

Паралельно проводять контрольний дослід, для чого до 1 мл води додають 1 мл реактиву I (примітка 2) і 1 мл 10% розчину L — альфа-лецитину у 95% спирті і потім роблять, як вказано вище. 1 мл 0,01 М розчину калію гідроксиду відповідає 0,002564 г кислоти пальмітинової або 10 міжнародним одиницям (МО) активності фосфоліпази А за одну хвилину.

Активність фосфоліпази А в 1 мг отрути бджолиної (Х) у МО розраховують за формулою:

$$X = \frac{(A - A_1) \cdot 4 \cdot 0,002564 \cdot 100}{a \cdot 3 \cdot 30 \cdot 0,0002564 \cdot (100 - b - c)} = \\ = \frac{(A - A_1) \cdot 4 \cdot 100}{a \cdot 9 \cdot (100 - b - c)},$$

де: А — кількість 0,01 М розчину натрію гідроксиду, яка була витрачена на титрування дослідної проби, мл;

А₁ — об'єм 0,01 М розчину натрію гідроксиду, витрачений на титрування контрольної проби, мл; а — наважка отрути бджолиної, мг;

4 — об'єм верхньої фази суміші (примітка 3) у досліджуваному розчині, мл;

в — втрата в масі при висушуванні, %;

3 — об'єм верхньої фази суміші (примітка 3) у досліджуваному розчині, мл;

с — вміст нерозчинних у воді домішок, %;

0,002564 — маса кислоти пальмітинової, яка відповідає 1 мл 0,01 М розчину натрію гідроксиду, г;

0,0002564 — маса кислоти пальмітинової, яка відповідає одній МО активності фосфоліпази А за одну хвилину, г.

Активність фосфоліпази А в 1 мг отрути бджолиної у перерахунку на сухий препарат без нероз-

Таблиця 4
Технологічні показники субстанції

Субстанція	Насипна густина, г/мл	Плинність, с/100 г	Вологовміст, %	Кут природного відкосу, град.
Отрута бджолина	0,37±0,05	відсутня	5,82±0,06	52,2±0,6

чинних у воді домішок повинна бути не менше 100 МО. Одержані результати представлені в табл. 3.

Також визначали активність ГАГГ. 0,01 г (т.н.) Отрути бджолиної розчиняють у 10 мл води. У дві пробірки поміщають по 0,1 мл отриманого розчину і по 0,2 мл ацетатного буферного розчину, у третю пробірку (контрольний розчин) поміщають 0,3 мл ацетатного буферного розчину. Пробірки поміщають у термостат при температурі $(37\pm0,1)^\circ\text{C}$ і через 5 хв у всі пробірки послідовно з інтервалом 30 с (за секундоміром) додають по 0,2 мл 0,2% розчину кислоти гіалуронової і продовжують термостатувати впродовж 15 хв (за секундоміром). Потім у пробірки послідовно з інтервалом 30 с додають розраховану за титром кількість 0,8 мол. розчину калію тетраборату і поміщають у баню при температурі 100°C на 3 хв (за секундоміром), після чого пробірки поміщають у льодяну баню на 10 хв. У охолоджені пробірки з інтервалом 30 с (за секундоміром) додають по 3 мл розведеного реактиву Еріха (примітка 4) і ставлять у термостат при температурі $(37\pm0,1)^\circ\text{C}$ на 20 хв (за секундоміром). Потім пробірки охолоджують до кімнатної температури (15 хв) і відразу ж вимірюють величини оптичної густини одержаних розчинів на спектрофотометрі при довжині хвилі 586 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм [2, 3].

Паралельно вимірюють величину оптичної густини розчину робочого стандартного зразка (РСЗ) глюкозаміну, для чого до 0,5 мл розведеного РСЗ глюкозаміну додають розраховану за титром кількість 0,8 мол. калію тетраборату, поміщають у водяну баню при температурі 100°C на 3 хв (за секундоміром) і далі роблять як написано вище. Як розчин порівняння використовують вміст третьої пробірки (контрольний розчин).

Активність ГАГГ в 1 мг отрути бджолиної (X) у МО (міжнародних одиницях) розраховують за формулою:

$$\begin{aligned} X &= \frac{D_1 \cdot 0,1808 \cdot 10 \cdot 1000 \cdot 100}{D_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 15 \cdot (100 - b - c)} = \\ &= \frac{D_1 \cdot 3616 \cdot 100}{D_0 \cdot a \cdot 3 \cdot (100 - b - c)}, \end{aligned}$$

де: D_1 — оптична густина досліджуваного розчину; D_0 — оптична густина розведеного РСЗ глюкозаміну; a — наважка препарату, мг; 10 — розведення наважки препарату;

0, 1 — маса препарату, взята для аналізу, мг; 15 — час ферментатійної реакції, хв; 0, 1808 — об'єм глюкозаміну у 0,5 мл розведеного РСЗ, мл; b — втрата в масі при висушуванні, %; c — вміст нерозчинних у воді домішок, %.

Показник втрати в масі при висушуванні визначали згідно з загальною методикою [2, 3] (метод d). Показник не повинен перевищувати 12%. Активність ГАГГ в 1 мг отрути бджолиної у перерахунку на сухий препарат без нерозчинних у воді домішок повинна бути не менше 70 МО. Одержані результати представлені в табл. 3.

Примітки:

1. Приготування розчинів препарату:

Розчин А. 0,05 г (т. н.) Отрути бджолиної поміщають у мірну колбу на 100 мл, розчиняють у 0,9% розчині натрію хлориду, доводять тим же розчином до мітки і фільтрують. Розчин використовують свіжоприготованим.

Розчин Б. 1 мл Розчину А поміщають у мірну колбу об'ємом 100 мл і доводять об'єм розчину водою до мітки.

2. Приготування реактиву I. 0,1 г Альбуміну поміщають у мірну колбу об'ємом 100 мл, розчиняють у 80 мл 0,05 мл розчину трис-буфера (pH 8,0). Додають 2 мл 0,05 мл розчину трилону Б і 0,4 мл 50% розчину кальцію хлориду та доводять об'єм до мітки 0,05 мол. розчином. Розчин зберігають у прохолодному місці протягом 6 діб.

3. Приготування екстрагуючої суміші. 300 мл н-гексану змішують з 200 мл 95% спирту етилового і додають 1 мл розведеної кислоти сірчаної. Суміш зберігають у склянці з притертю пробкою у прохолодному місці протягом 30 діб.

4. Приготування реактиву Ерліха. 10,0 г п-Диметиламінобензальдегіду перекристалізованого поміщають у мірну колбу об'ємом 100 мл, додають 12,5 мл концентрованої кислоти соляної і доводять об'єм розчину кислотою оцтовою льодяною [2, 3] до мітки.

З метою розробки проекту АНД на отруту бджолину нами були вивчені технологічні властивості даної субстанції (табл. 4).

Статистичну обробку результатів експериментальних досліджень проводили загальноприйнятими методами [3, 4, 5].

ВИСНОВКИ

1. Опрацьовані сучасні літературні дані щодо створення лікарських препаратів для лікування алергічних дерматитів.

2. Проведено технологічні та фізико-хімічні дослідження, вивчено якісний та кількісний вміст субстанції природного походження з отрутою бджолиною. Отримані дані можуть бути покладені в основу при розробці аналітичної нормативної документації на субстанцію.

ЛІТЕРАТУРА

1. Волкославская В.Н. // Дерматол. та венерол. — 2002. — № (17). — С. 67-70.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експериментальний фармакопейний центр". — 1-е вид. — Х.: PIPEГ, 2001. — 556 с.
3. Державна фармакопея України / О.І.Тихонов, М.Ф.Пасечник, Т.В.Калініченко та ін. — 1-е вид. Доп. 1. — М., 2004. — С. 491-494.
4. Лапач С.М., Чубенко А.В., Бабич П.М. Статистичні методи в медико-біологічних дослідженнях із застосуванням Exel. — К.: Моріон, 2001. — 408 с.
5. Лапач С.Н., Пасечник М.Ф., Губенко А.В. Статистические методы в фармакологии и маркетинге фармацевтического рынка. — К.: ЗАТ "Укрспецмонтажпроект", 1999. — 312 с.
6. Матеріали ІІІ з'їзду апітерапевтів України / В.П.Черних, О.І.Тихонов, Т.Г.Ярних. — Х.: Вид-во НФаУ: Золоті сторінки, 2006. — 448 с.
7. Наказ №165 від 03.08.89 р. "О развитии гомеопатического метода в медицинской практике и улучшении организации обеспечения населения гомеопатическими лекарственными средствами".
8. Allison D.D., Grande-Allen K.J. // Tissue Eng. — 2006. — Vol. 12, №8. — P. 2131-2140.
9. Annand R.R, Kontoyianni M., Penzotti J.E. et al. // Biochemistry. — 1996. — Vol. 35. — P. 4591-4601.
10. Dennis E.A. // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269, №18. — P. 13057-13060.
11. German Homeopathic Pharmacopoeia. — British Homeopathic Association, 1991. — Suppl. 5401 p.
12. Goldberg A., Livni E., Mekori Y.A. et al. // Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. — 1991. — Vol. 95, №2-3. — P. 191-194.
13. Gmachl M., Kreil G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1993. — Vol. 90. — P. 3569-3573.
14. Hider R.C. // Endeavour. — 1988. — Vol. 12, №2. — P. 60-65.
15. Nagaya H., Ymagata T., Ymagata S. et al. // Ann. Rheum. Diss. — 1999. — Vol. 58, №3. — P. 186-188.
16. Yuan Y., Jackson S.P., Newnham H.H. et al. // Blood. — 1995. — Vol. 86, №11. — P. 4166-4174.
17. Nicolas J.P., Lin Y., Lambeau G., Ghomashchi F. // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272, №11. — P. 7173-7181.
18. Taylor M.J., Clark C.L. // Endocrinol. — 1989. — Vol. 125, №3. — P. 1389-1397.
19. Watanabe N., Zmijewski J.W., Takabe W. et al. // Am. J. Pathol. — 2006. — Vol. 168, №5. — P. 1737-1748.

УДК 615.015.032:615.454.1.014.22:616-08-031.84:616.5-001.1
ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ГОМЕОПАТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА В ФОРМЕ МАЗИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ДЕРМАТИТОВ

А.І.Тихонов, Н.А.Черная, О.А.Красильникова
Проработанные литературные данные по состоянию заболеваний на аллергические дерматиты в Украине. Изучены фармакологические свойства яда пчелиного как субстанции для создания дерматологической мази. Приведены результаты исследований технологического и физико-химического анализа яда пчелиного. Определены показатели активности фосфолипазы А и глюкозамингиликангидролазного комплекса. Полученные результаты могут быть положены в основу при разработке аналитической нормативной документации для входного контроля на субстанцию.

UDC 615.015.032:615.454.1.014.22:616-08-031.84:616.5-001.1
THE PROSPECTS OF CREATING A HOMOEOPATHIC MEDICATION IN THE FORM OF THE OINTMENT FOR TREATING ALLERGIC DERMATITES

A.I.Tikhonov, N.A.Chornaya, O.A.Krasilnikova
The literature data about the state of the allergic dermatitis diseases in Ukraine have been worked out. The pharmacological properties of the bee poison as a substance for creating a dermatological ointment have been studied. The research results of the technological and physical and chemical analysis of the bee poison have been given. The indexes of the activity of phospholipase A and glucosaminoglycan hydrolase complex have been determined. The results obtained can be a basis in developing the analytical normative documentation for the substance's ongoing control.