

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
НИЖЕГОРОДСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

СИДОРОВА МАРТА ВАЛЕРЬЕВНА

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ
ФИТИНОВОЙ КИСЛОТЫ С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ
АМИНАМИ КАК КОМПОНЕНТОВ ГИДРОФИЛЬНЫХ ГЕЛЕЙ

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Н.Б. Мельникова

Нижний Новгород – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	11
1.1. Физико-химические свойства фитиновой кислоты и её комплексов с металлами и аминами	12
1.1.1. Кислотно-основные свойства	12
1.1.2. Комплексы фитиновой кислоты и ионов металлов.....	16
1.1.3. Комплексообразование фитиновой кислоты с органическими лигандами.....	19
1.2. Фармакологические свойства фитиновой кислоты и фитатов	23
1.2.1. Медико-биологические свойства, доказанные в клинической практике и в эксперименте.....	23
1.2.2. Роль фитиновой кислоты как антиоксиданта в снижении оксидативного стресса.....	25
1.2.3. Метаболизм и биотрансформация фитиновой кислоты и её солей	29
1.3. Физико-химические и фармакологические свойства аминов (ксимедона, глюкозамина и трисамина) как потенциальных компонентов солевых комплексов с фитиновой кислотой	32
1.4. Методы анализа фитиновой кислоты, аминов и комплексов.....	40
1.4.1. Известные методы качественного и количественного определения фитиновой кислоты.....	40
1.4.2. Методы анализа аминов (ксимедона, глюкозамина и трисамина)	47
ГЛАВА 2. Объекты, методы и аналитические методики исследования. 51	
2.1. Материалы и приборы	51
2.2. Аналитические методики определения фитиновой кислоты, аминов (ксимедона, глюкозамина, трисамина) и их солевых комплексов.....	52
2.2.1. Количественное определение фитиновой кислоты в комплексах и свободном виде по содержанию общего фосфора.....	52
2.2.2. Методика анализа фитиновой кислоты с реактивом Вэйда в присутствии аминов.....	55
2.2.3. Идентификация и количественное определение ксимедона УФ-спектральным и ВЭЖХ методами в воде и растворах фитиновой кислоты....	56
2.2.4. Аналитические методики определения натрия гиалуроната в растворе	57
2.2.5. Методика проведения потенциометрического титрования фитиновой кислоты аминами.....	58
2.3. Методика выделения комплексов фитиновой кислоты с аминами в твёрдом состоянии	58
2.4. Методика приготовления гидрофильного геля комплекса фитиновой кислоты с ксимедоном.....	60
2.5. Медико-биологические исследования комплексов фитиновой кислоты с биологически активными аминами.....	60

2.5.1. Исследования влияния фитиновой кислоты и её производных на процессы липопероксидации <i>in vitro</i>	61
2.5.2. Исследование эффективности действия гидрофильных гелей с комплексом фитиновой кислоты и ксимедона на процессы заживления ожоговых ран у крыс и антиоксидантной активности	63
ГЛАВА 3.	66
3.1. Исследование взаимодействия фитиновой кислоты и ксимедона в водной среде и изучение свойств комплексов фитиновой кислоты с ксимедоном в твёрдом состоянии	66
3.2. Комплексы фитиновой кислоты с глюкозамина гидрохлоридом и трисамином	78
3.3. Доказательство антиоксидантной активности фитиновой кислоты и её комплексов с аминами	89
3.3.1. Изучение влияние фитиновой кислоты на баланс про- и антиоксидантных систем крови.....	89
3.3.2. Сравнительный анализ антиоксидантных эффектов комплексов фитиновой кислоты с аминами.....	94
3.3.3. Выбор дозы фитиновой кислоты для образования комплекса с ксимедоном	97
3.3.4. Изучение антиоксидантной активности комплексов фитиновой кислоты и ксимедона	98
ГЛАВА 4. Разработка противоожогового геля комплекса фитиновой кислоты и ксимедона.	104
4.1. Обоснование состава и лабораторной технологии приготовления геля.....	104
4.2 Разработка методик установления подлинности и количественного определения активных компонентов в лекарственной форме «Ксифит»	107
4.2.1. Разработка пробоподготовки для проведения анализа действующих веществ гидрофильного геля «Ксифит».....	107
4.2.2. Разработка норм качества и валидационных характеристик методики определения ксимедона в геле «Ксифит»	109
4.2.3. Разработка норм качества и валидационных характеристик методики определения фитиновой кислоты в геле «Ксифит»	111
4.2.4. Разработка норм качества и валидационных характеристик методики определения натрия гиалуроната в геле «Ксифит».....	114
4.2.5. Разработка норм качества и валидационных характеристик методик определения нипагина в геле «Ксифит».....	116
4.2.6. Установление подлинности трисамина в геле «Ксифит».....	117
4.2.7. Спецификация на новый противоожоговый гель «Ксифит».....	117
4.3. Репаративные свойства геля на основе комплекса фитиновой кислоты и ксимедона	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ:	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:	126
ПРИЛОЖЕНИЯ:.....	146

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- InsP₆H₁₂, I, ФК – фитиновая кислота
- ТСА – трихлоруксусная кислота
- ЛС – лекарственное средство
- Кси, II – ксимедон
- ГА, III – глюкозамин
- ТА, IV – трисамин
- СОД – супероксиддисмутаза
- СРО – свободно-радикальное окисление
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- АКМ – активные кислородные метаболиты
- НАД – никотинамиддинуклеотид
- НАДФ – никотинамиддинуклеотид-фосфат
- АФК – активные формы кислорода
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- цАМФ –циклический аденозинмонофосфат
- НСТ-тест –тест восстановления нитросинего тетразолия
- ИЛ – интерлейкин
- ЯМР – ядерно-магнитный резонанс
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- UV-Vis – спектрофотометр с ультрафиолетовым детектором
- УФ-спектроскопия – ультрафиолетовая спектроскопия
- ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия
- D₂O – дейтерированная вода
- ХЧ – химически чистый
- ТУ – технические условия
- ПМР – протонно-магнитный резонанс
- БХЛ – биохемилюминометр

ДК – диеновые конъюгаты

ТК – триеновые конъюгаты

ОШ – основания Шиффа

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

АОА – антиоксидантная общая активность

МДАпл – малоновый диальдегид в плазме крови

ГФ – государственная фармакопея

НД – нормативная документация

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Фитиновая кислота, содержащаяся в зерновых и бобовых культурах (до 85% от общего содержания фосфора), семенах масличных культур, пыльце, клубнях, орехах, представляет интерес как компонент новых лекарственных средств (ЛС), поскольку проявляет свойства регулятора многих метаболических процессов, в том числе нормализации кальций-фосфорного и ионного баланса, а также является экзогенным антиоксидантом (Р.Т. Hawkins, 1993; К.-М. Lee, 2012). Доказана антиоксидантная и противоопухолевая активность фитиновой кислоты в эксперименте на животных при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, молочной и предстательной желез (А.М. Shamsuddin, 1995, 1996), а также ингибирование перекисного окисления липидов при поражении клеток кишечника и печени (S. Muraoka, 2004; A. Zajdel, 2013) и регулирование действия ксантиноксидазы (S. Muraoka, 2004).

Фитиновая кислота – 1,2,3,4,5,6-гексакис(дигидрофосфат) мио-инозита ($\text{InsP}_6\text{H}_{12}$, I), характеризуется 12 ионизируемыми протонами и может взаимодействовать как с многовалентными катионами (замещение и хелатирование с такими ионами металлов, как Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ba^+ и др. (C. De Stefano, 2002; A.V.F. Nielsen, 2013), протонированными аминами, так и с белками (C. De Stefano, 2004; S. Yu, 2012).

Природные фитаты являются производными кислоты I, а кальциево-магниевые соли I называют фитином (E. Graf, 1987). Плохая растворимость фитатов является причиной ухудшения биодоступности I как компонента пищи (S. Yu, 2012).

Для повышения биодоступности фитатов их можно применять в виде комплексных соединений с аминами, образующимися в результате донорно-акцепторного и нековалентного взаимодействий. Стабильность фитатов аминов является довольно высокой, и они способны защищать I от взаимодействия с кальцием в организме человека.

Представляло интерес получить новые лекарственные средства на основе комплексов фитиновой кислоты и аминов-метаболических широкого спектра действия. Были выбраны: ксимедон (1-(β -оксиэтил)-4,6-диметил-1,2-дигидро-2-оксипиримидин) из классов оксопиримидинов, проявляющий

антиоксидантные, противовоспалительные и репаративные свойства; глюкозамин (гидрохлорид 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозы), относящийся к аminosахарам и способствующий уменьшению деградации коллагена хряща, развивающейся в результате избыточной перекисидации липидов и окисления белков (M.L. Tiku, 2007); трисамин (трис-оксиметил-аминометан) изоосмотичный плазме крови и обладающий буферными свойствами (M.Д. Машковский, 2012).

Следует ожидать, что фитаты аминов способны не только обуславливать синергетическое антиоксидантное действие фитиновой кислоты, но и обеспечивать более полную коррекцию оксидативного стресса и метаболических процессов при различных заболеваниях, в том числе коллаген-ассоциированных, а также способны выполнять роль вектора доставки ЛВ и обуславливать хорошую биодоступность при сохранении других ценных свойств фитиновой кислоты.

Степень разработанности темы. В настоящее время, исследования, посвященные изучению комплексообразования фитиновой кислоты с органическими лигандами, рассматривают только процессы взаимодействия фитиновой кислоты и её солей с веществами, входящими в состав продуктов питания, а также органическими соединениями организма человека и животных (Carli L.D., 2009; Midorikawa K., 2001; Nielsen A.V.F., 2013; Thompson D.B., 1982; Veiga N., 2006; Yu S., 2012). Фитиновая кислота образует комплексы с белками, прочность которых зависит от pH (Lönnerdal B., 2002). В работах Stefano C. De (2002, 2004) изучено взаимодействие биогенных аминов с фитат анионом в широком интервале pH и показана возможность образования прочно связанных комплексов. Свободная энергия Гиббса ($-\Delta G^0$), рассчитанная на одну протонированную аминогруппу равна $4,0 \pm 0,2$ кДж/моль, что характеризует, главным образом, нековалентное взаимодействие фитиновой кислоты с биогенными аминами. Авторами обсуждается вклад электростатических взаимодействий, водородных связей при образовании комплексов и прогнозируются зависимость прочности комплексов от заряда аниона.

Целью настоящей работы является исследование физико-химических и антиоксидантных свойств комплексов фитиновой кислоты с биологически активными аминами и разработка состава гидрофильного геля комплексов.

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

1) Изучение физико-химических свойств комплексов фитиновой кислоты и биологически активных аминов – ксимедона, глюкозамина, трисамина в водной среде и в твёрдом состоянии.

2) Разработка методов идентификации и количественного определения комплексов фитиновой кислоты и аминов.

3) Оценка антиоксидантной активности комплексов фитиновой кислоты глюкозамина, ксимедона и трисамина по показателям липопероксидации, общей антиоксидантной активности и активности супероксиддисмутазы в исследованиях *in vitro* в норме и при окислительном стрессе.

4) Разработка состава и лабораторной методики приготовления гидрофильного геля комплекса фитиновой кислоты и амина, обладающего наибольшей антиоксидантной активностью, исследование физико-химических и фармакологических свойств геля в эксперименте на крысах.

5) Разработка методов анализа компонентов геля комплекса фитиновой кислоты и амина и нормативной документации.

Научная новизна.

• Впервые получены и изучены физико-химические свойства комплексов фитиновой кислоты с биологически активными аминами – ксимедоном, трисамином и с глюкозамина гидрохлоридом. Установлено, что катионидной частью комплексов являются протонированные амины, а инозитольный цикл фитиновой кислоты сохраняет свою структуру при стехиометрии амин:фитиновая кислота в комплексах от 5:1 до 10:1. Экспериментально доказана высокая антиоксидантная активность комплексов *in vitro* в плазме крови человека.

• Впервые разработан состав нового противоожогового гидрофильного геля комплекса фитиновой кислоты и ксимедона на основе натрия гиалуроната, эффективность которого доказана в эксперименте на крысах.

• Разработаны методики анализа (идентификация и количественное определение) компонентов геля.

Теоретическая и практическая значимость. Разработанные методики анализа компонентов противоожогового гидрофильного геля комплексов фитиновой кислоты и ксимедона внедрены в ООО «Созидатель». Разработан

проект фармакопейной статьи на новый противожоговый гель (акт внедрения от 15.01.2015 г.).

Результаты диссертационных исследований используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акты внедрения от 23.12.2014 г.), Государственном бюджетном образовательном учреждении среднего профессионального образования Нижегородской области «Нижегородский медицинский базовый колледж» (акт внедрения от 19.12.2014 г.).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России (номер государственной регистрации 01201063248) по научной проблеме «Разработка и исследование новых лекарственных средств на основе природных и синтетических веществ».

Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты физико-химических исследований (ИК- УФ- ^1H - ^{13}C - ^{31}P - ЯМР спектроскопия, потенциометрическое титрование, элементный анализ на С, N, H, P) по доказательству состава комплексов фитиновой кислоты и аминов – ксимедона, глюкозамина, трисамина.

2. Результаты по установлению идентификации и количественного определения комплексов фитиновой кислоты и ксимедона в растворе.

3. Оценка антиоксидантной активности комплексов фитиновой кислоты и аминов (ксимедона, глюкозамина, трисамина) *in vitro* на плазме крови человека.

4. Экспериментальное обоснование оптимального состава гидрофильного противожогового геля.

5. Методика анализа компонентов гидрофильного геля комплекса фитиновой кислоты с ксимедоном.

6. Результаты по разработке норм качества противожогового гидрофильного геля.

7. Оценка репаратных свойств противоожогового геля комплекса фитиновой кислоты с ксимедоном.

Достоверность научных положений и выводов базируется на достаточных по своему объему данных и количеству материала, современных методах исследования и статистической обработке данных.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на Всероссийской молодежной научной школе «Биоматериалы и нано-биоматериалы: актуальные проблемы и вопросы безопасности» (Казань, 2012); X Всероссийской сессии молодых учёных и студентов (Нижний Новгород, 2013); Восьмой национальной научно-практической конференции с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2014); VI Международной научной конференции «Наука в современном обществе» (Ставрополь, 2014); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной науки» (Уфа, 2015).

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 4 статьях в отечественных журналах и в форме тезисов докладов 5 конференций.

Личный вклад автора. Результаты, приведённые в диссертации, получены при непосредственном участии автора в проведении физико-химических и биологических исследований комплексов фитиновой кислоты с аминами в растворах, в твёрдом состоянии и в лекарственной форме. Автор является основным исполнителем написания публикаций по теме диссертации и разработке нормативной документации на предложенный состав геля.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной методам и объектам исследования, двух глав собственных исследований, выводов, списка литературы, включающего 184 наименований отечественных и зарубежных авторов и приложения. Работа изложена на 166 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы, 48 рисунков, 5 схем.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

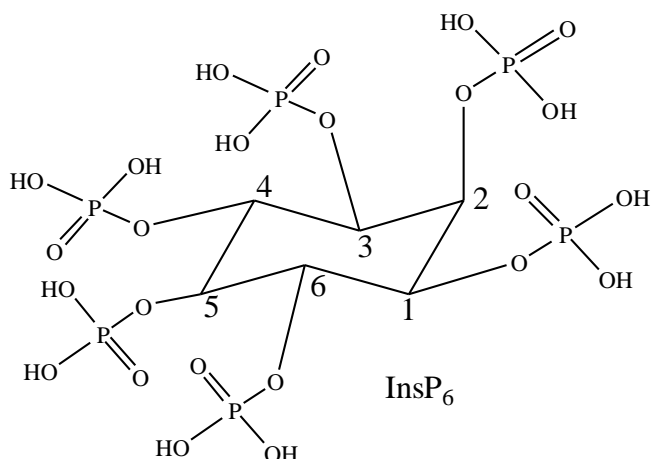
В настоящее время наблюдается тенденция поиска и синтеза новых фармацевтических субстанций и векторов доставки лекарственных веществ из класса сахаров, биотрансформация которых проходит через фосфорилирование. Производные фитиновой кислоты, являющиеся фосфорилированными сахарами, имеют преимущество перед другими лекарственными веществами природного происхождения, поскольку содержат до шести фосфатных групп в одном инозитном цикле.

Фитиновая кислота образуется во время созревания семян и составляет 60-90% от общего содержания фосфора в растениях [143]. Наиболее богаты этим компонентом злаковые, бобовые и масличные культуры [85]. Основным природным источником фитина и мезоинозита, доступным в России, являются конопляное семя и жмых [40].

Фитиновую кислоту как вещество медико-биологического значения начали активно изучать в 70х годах XX века. В исследованиях тех лет [57, 80, 82, 88, 154], фитин, как источник мио-инозита и шести фосфатных групп, позиционируется в качестве средства, регулирующего фосфорно-кальциевый обмен, и показан при заболеваниях, вызванных недостатком фосфора в организме, например способствующий улучшению деятельности нервной системы и корректирующий обмен в костной и соединительной ткани. В справочнике Д.М. Машковского [20] описана смесь кальциевых и магниевых солей фитиновой кислоты, под названием фитин, который показан при различных заболеваниях нервной системы, сосудистой гипотонии, истерии, неврастении, половой слабости, недостатке питания, рахите, остеомалации, малокровии, туберкулезе, диатезах, скрофулезе и др.

1.1. Физико-химические свойства фитиновой кислоты и её комплексов с металлами и аминами

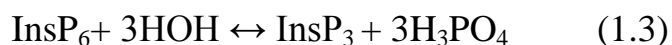
Фитиновая кислота – мио-инозитгексакисфосфат или 1,2,3,4,5,6-гексакис (дигидрофосфат) мио-инозит является крайне реакционно-способным веществом за счёт наличия в структуре двенадцати подвижных протонов и может существовать в различных формах [158, 182].



Молекулярная формула фитиновой кислоты – C₆H₁₈O₂₄P₆, молекулярная масса – 660,04 г/моль.

1.1.1. Кислотно-основные свойства

В водных растворах фитиновая кислота легко гидролизуется, образуя фосфаты инозита (инозит пента-(InsP₅), тетра-(InsP₄) и трифосфаты (InsP₃)), которые также называют фитиновой кислотой или фитатами и содержат от одного до пяти остатков фосфорной кислоты (рис.1.1). В настоящее время все формы фитатов и фитиновой кислоты могут быть получены методом биотехнологического синтеза [137, 182].



Структура фитатов варьируется в зависимости от разбавления и силы основания.

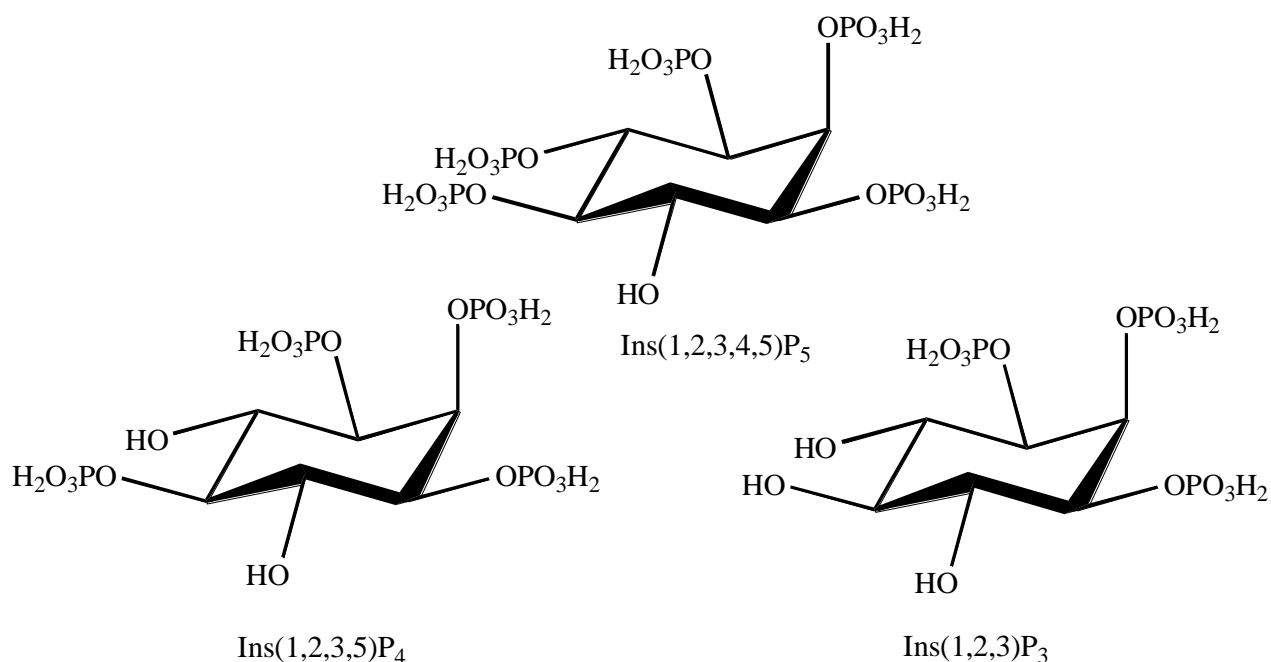
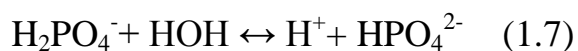
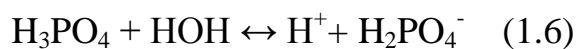


Рис.1.1. Основные формы фитиновой кислоты, образующиеся при гидролизе фитиновой кислоты InsP₆.

Образованная при гидролизе фитиновой кислоты фосфорная кислота подвергается вторичному гидролизу преимущественно по первой ступени, что вносит дополнительный вклад в концентрацию протонов H₃O⁺ и объясняет низкие значения pH водных растворов фитиновой кислоты:



В работе L. Oatway и T. Vasanthan [135] с помощью программы Marvin Molecule рассчитаны величины рКа и молекулярная структура фитиновой кислоты (рис. 1.2).

Как можно судить по величинам рКа, фитиновая кислота способна выступать в роли высоко отрицательно заряженного аниона в широком диапазоне pH и, следовательно, активно взаимодействовать как с

многовалентными катионами, протонированными аминами, так и с белками [135, 158, 182].

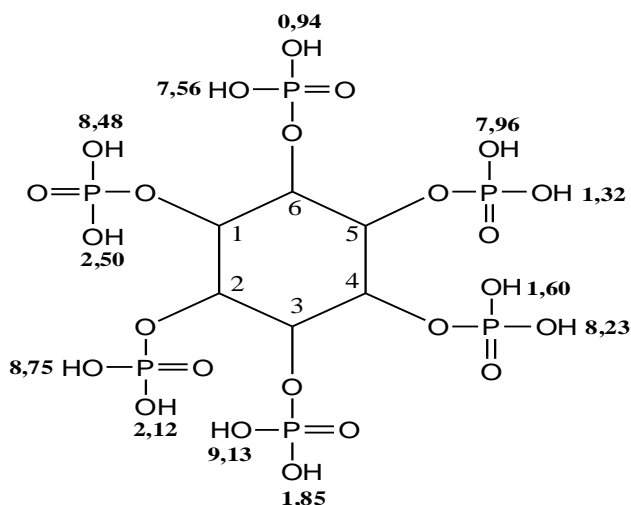


Рис.1.2. Величины pK_a , рассчитанные для фитиновой кислоты [135] (Marvin Molecule).

Как мы можем видеть из предложенной структуры, реакционная способность гидроксильных групп в составе фосфатных групп фитиновой кислоты не эквивалентна. По этой причине, в большинстве исследований, свойства фитиновой кислоты рассматривают на примере её натриевой или калиевой соли.

Так, на примере калиевой соли методом потенциометрического титрования исследованы изменения в ионизации $InsP_6$ в работе М. Sala и D. Макис [147]. В эксперименте, калиевая соль фитиновой кислоты $K_2H_{10}InsP_6$ выступает в роли титруемого раствора. В качестве титрантов использовали стандартизованные растворы NaOH и Bu_4NOH . Из кривых титрования (рис. 1.3) видно, что ионы натрия хорошо стабилизируют фитат анион. При использовании NaOH в качестве титранта (кривая B), значение pK_a $K_2H_{10}InsP_6$ более значительно в сравнении с опытом, где в роли титранта выступал Bu_4NOH (кривая A). Дополнительное введение в систему ионов натрия за счёт добавления NaCl (кривая D) показывает ещё большую кислотность. Анализ кривых титрования показывает, что $K_2H_{10}InsP_6$

содержит три или четыре протона с высокой кислотностью (в среднем $pK_a < 3$) два со слабой ($pK_a 7$) и четыре очень слабых кислотных протона ($pK_a > 8$).

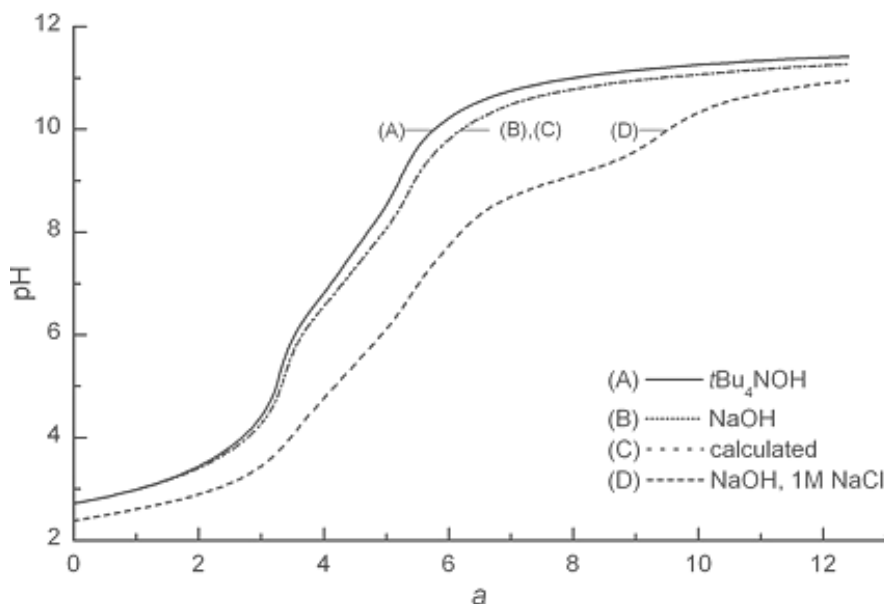


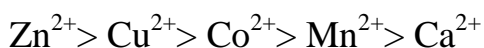
Рис. 1.3. Титрование 30 мл 0,000916 М раствора $K_2H_{10}InsP_6$ 0,00966 М раствором tBu_4NOH (A), 0,00946 М раствором NaOH (B) и расчетные значения этой кривой (C). Кривая (D) соответствует титрованию (B) в присутствии 1 М раствора NaCl. Параметр по оси абсцисс является число молей титранта на моль $K_2H_{10}InsP_6$.

Таким образом, программный расчёт значений pK_a (рис.1.2) согласуется с данными, полученными при анализе кривой кислотно-основного титрования фитиновой кислоты (рис.1.3), что позволяет рассматривать фитиновую кислоту в качестве как сильной, так и очень слабой кислоты (pK_a 1-9). Ряд исследователей, находят зависимость этого фактора от ионной силы раствора, температуры и других [59, 72, 147, 165]. В нейтральной среде фосфатные группы фитиновой кислоты диссоциируют лишь частично, приобретая один или два отрицательных заряда. Образующиеся анионы вместе с анионами калиевой соли $InsP_6$ могут прочно хелатировать положительно заряженные ионы металлов, протонированные аминокгруппы и др., причём связь этих катионов с фосфатными группами менее прочная.

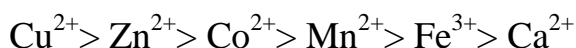
Таким образом, фитиновая кислота является полидентатным лигандом, способным хелатировать катионы путем образования нескольких координационных связей [40].

1.1.2. Комплексы фитиновой кислоты и ионов металлов

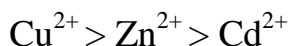
Комплексообразующие свойства фосфатных групп фитиновой кислоты позволяют ей активно хелатировать катионы металлов, особенно обладающие высоким сродством к инозитфосфатам Cu^{2+} и Zn^{2+} . Стабильность комплексов фитиновой кислоты и катионов металлов изучена рядом исследователей. В работах Maddaiah V. T. (1964) предложена следующая последовательность катионов металлов, расположенных в порядке снижения прочности комплекса фитиновая кислота и металла [123]:



Исследования Vohra P. (1965), проводимые с использованием других методических подходов предлагают несколько иной ряд [170]:



Следующая последовательность, полученная в исследовании Persson H. (1998), справедлива по отношению к прочности комплексов, образуемых ионами металлов как с фитиновой кислотой так и с низшими фосфатами инозита (InsP_3 - InsP_6) при значениях pH 3-7 [139]:



В работе установлено, что прочность комплексов фитиновой кислоты с ионами металлов снижается при уменьшении количества фосфатных групп в составе фитиновой кислоты. Важно заметить, что для фитина биологического происхождения, устойчивость и минеральный состав комплекса определяется не только аффинностью катионов. Однако фитиновая кислота, обнаруженная в живых организмах, находится в них в основном в виде магниевых, кальциевых и калиевых солей [95].

При избытке фитиновой кислоты в растворе, содержащем катионы металлов, преимущественно образуются водорастворимые комплексы с эквимольным соотношением (1:1). В другом крайнем случае (избыток катионов металлов) образуются слабо- и нерастворимые соли [165]. При этом растворимость солей фитиновой кислоты достигает максимальных значений как при очень низком, так и при очень высоком содержании катионов металлов в растворе фитиновой кислоты [58, 66, 67, 86].

Одновременное присутствие катионов нескольких металлов способствует увеличению количества нерастворимых комплексов, т.е. они не конкурируют между собой за молекулу фитиновой кислоты, а связываются с ней все. Например, растворимость фитатов значительно снижается в присутствии в растворе катионов Ca^{2+} одновременно с катионами других металлов [73, 149, 166]. Фитиновая кислота в виде кальция фитата показывает большое сродство к Zn^{2+} с образованием совместных осадков [121, 122, 150]. Однако, в присутствии высокой концентрации ионов Zn^{2+} , кальций способен вытеснять цинк из центров связывания фитиновой кислоты, при этом растворимость комплекса повышается. Таким образом, количество свободного Zn^{2+} прямо пропорционально концентрации Ca^{2+} [73, 122, 177]. Интересно, что Mg^{2+} , также усиливает соосаждение Zn^{2+} с фитиновой кислотой, но оказывает менее выраженный эффект, чем Ca^{2+} [176-178].

При взаимодействии фитиновой кислоты с ионами какого-либо одного металла, например марганца, кобальта, никеля, меди, олова или цинка, образуются нерастворимые соли, в составе которых соотношение фитиновой кислоты и катионов варьирует от 1:2 до 1:5. Присутствие в растворе хлорид-ионов смещает стехиометрическое соотношение до 1:6 в следствие способности ионов Cl^- вызывать более полную депротонизацию остатков фосфорной кислоты [170] и повышать устойчивость образуемых комплексов [16].

Важным фактором, влияющим на растворимость солей фитиновой кислоты, является уровень рН среды [85, 147]. Фитаты кальция, кадмия, цинка и меди лучше растворимы при значениях рН ниже 4 – 5, тогда как фитат магния хорошо растворим как в кислой среде, так и при рН до 7,5 [58].

В работе М. Sala и D. Макус [147] изучено влияние рН на процессы комплексообразования фитиновой кислоты с ионами железа (III). Установлено, что в отличие от других ионов металлов комплексообразование ионов Fe(III) затруднено как в сильно кислой так и в сильно щелочной средах (крайние точки значений рН). При низких значениях рН взаимодействию ионов железа, по видимому, препятствует сильное протонирование фитиновой кислоты, при высоких – гидратирование железа. Нерастворимые комплексы фитиновой кислоты с металлами осаждаются в виде аморфной массы, насыщенной водой (до 22 молекул воды на 1 молекулу фитата), что затрудняет проведение кристаллографического анализа [63]. Однако имеются данные по исследованию кристаллической структуры фитата железа (III), в результате которого установлено, что связь фосфатных групп с железом соизмерима по прочности с ковалентной. Осаждение комплексов начинается, когда от 2 до 4 ионов Fe^{3+} взаимодействуют как минимум с 4 из 6 фосфатных групп молекулы фитиновой кислоты [133, 169]. Теоретически, каждая фосфатная группа фитиновой кислоты взаимодействует с двумя ионами Fe^{3+} , каждый из которых, в свою очередь, связан с тремя фосфатными группами двух разных молекул фитата [124, 133]. Константа устойчивости комплексов фитиновой кислоты и железа (III) довольно высока, поэтому в основе различных анализов на подлинность фитиновой кислоты лежат реакции с окрашенными солями железа [133, 161].

Таким образом, в настоящее время известно, что стабильность и растворимость комплексов фитиновой кислоты и металлов зависит от величины рН, природы катиона, мольного соотношения фитиновой кислоты и катиона, а также присутствия других соединений в растворе [16, 58, 67, 73, 85, 122, 147, 165]. рН является важным фактором, влияющим на

растворимость фитатного комплекса, причем фитаты более растворимы при низких, чем при более высоких значениях рН. Ca^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} и Cu^{2+} соли, как правило, растворимы при рН ниже 4-5, в то время как Mg-фитат, растворим как в кислой среде, так и при рН до 7,5. В отличие от этого железа фитаты нерастворимы в диапазоне значений рН 1,0-3,5, а при эквимольном соотношении Fe^{3+} в фитате и растворимость возрастает при рН выше 4.

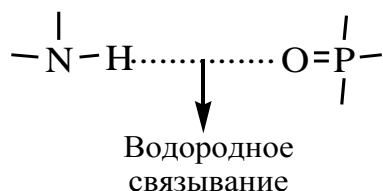
1.1.3. Комплексообразование фитиновой кислоты с органическими лигандами

Образование комплексов органических кислот с органическими аминами в растворе протекает по более сложному механизму, чем с металлами, однако, основные взаимодействия можно представить донорно-акцепторным механизмом или реакциями Льюисовских кислот и оснований.

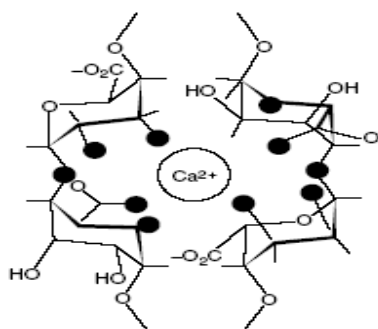
В водных растворах большое значение имеет водородное связывание, в растворах фитиновой кислоты оно возможно как по типу внутримолекулярного, так и межмолекулярного взаимодействия. Межмолекулярным взаимодействием обусловлена высокая растворимость фитиновой кислоты в воде, которая усиливается за счёт водородного связывания с водой.

Амины, как основания Льюиса, а также протонированные амины, как сопряженные этим основаниям кислоты, будут взаимодействовать с фитиновой кислотой либо с протоном, либо с основным кислородом фитат аниона по типу слабого донорно-акцепторного взаимодействия. При этом следует учесть, в это взаимодействие могут вносить вклад различные силы (связи) – Вандер-Ваальсовское притяжение (индуцированные диполи - 0,5-1,0 ккал/моль); диполь-дипольное связывание (1,0 – 10,0 ккал/моль); ионное связывание (5 ккал/моль), характерное при взаимодействии фитиновой кислоты с протонированным амином; ион-дипольное взаимодействие (1,0-5,0 ккал/моль).

Можно предположить, что такая сложная молекула, как молекула фитиновой кислоты, способна образовывать в водной среде Н-водородные комплексы, за счёт всех указанных типов связывания. Вариантом сильного водородного связывания с максимальным протонирование донорного атома будут являться солевые комплексы [132].



Кроме того, следует учесть возможность формирования и комплексов включения, предполагающее окружение одного соединения в молекулярную «рамку» («решетку») других соединений. Наибольшую склонность к образованию таких структур имеют сахара и полисахариды к производному которых относится фитиновая кислота.



В настоящее время, исследования, посвященные изучению комплексообразования фитиновой кислоты с органическими лигандами, рассматривают только процессы взаимодействия фитиновой кислоты и её солей с веществами, входящими в состав продуктов питания, а также органическими соединениями организма человека и животных [63, 124, 133, 161, 169, 182].

Важно заметить, что фитиновая кислота, являясь полидентатным лигандом, выступает в роли отрицательно заряженного аниона, в связи с чем, способна образовывать комплексы только с положительно заряженными пищевыми компонентами, такими как белки и углеводы в протонированной форме (рис 1.4).

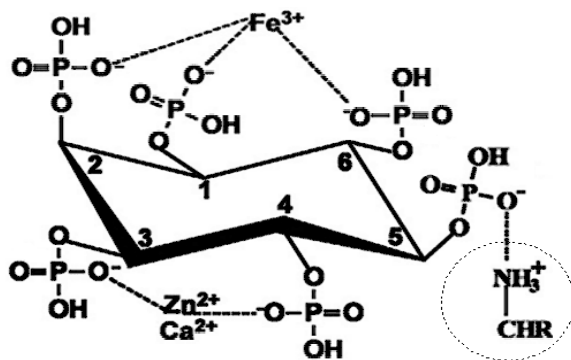


Рис. 1.4. Электростатическое взаимодействие фитиновой кислоты с положительно заряженными лигандами [182].

Доказано, что потребление фитиновой кислоты и фитатов снижает концентрацию глюкозы (гликемический индекс) в крови человека [63, 133, 169]. Это объясняется образованием комплексов фитиновой кислоты с углеводами, что снижает их растворимость и отрицательно влияет на усвоение и всасывание глюкозы. Исследование комплексообразования фитиновой кислоты с крахмалом, показало, что взаимодействие может протекать либо по типу непосредственного связывания крахмала и фитиновой кислоты водородными связями, либо опосредованно через белки, ассоциированные с крахмалом [169].

Фитиновая кислота образует комплексы с белками, прочность которых зависит от pH [121]. При значении pH ниже изоэлектрической точки белка [57, 150], фосфатные группы фитиновой кислоты, связываются с катионидной группой основных аминокислот белка, например, аргинина, гистидина, лизина и образуют двоичные белок-фитатные комплексы. Образующиеся комплексы растворяются только при значениях pH ниже 3,5. Исследования *in vitro* показывают, что характер и сила взаимодействия фитиновой кислоты и белка находится в прямой зависимости от природы и исходных свойств белков (в том числе растворимости), а также наличия в среде ионов металлов [177].

В работе S. Yu (2012) изучено взаимодействие фитиновой кислоты с белками на примере бычьего β -казеина и соевого белка [182]. Установлено, что степень агрегации β -казеина и белка сои зависит от концентрации фитиновой кислоты. При этом, в присутствии фитиновой кислоты одной

концентрации, комплексообразование с β -казеином происходит интенсивнее, чем с соевым белком. Анализ влияния рН на примере тех же лигандов показал, что комплексы фитат-соевый белок образовывались в диапазоне рН от 2,5 до 3,8 и полностью исчезали при рН ниже 2,0. Авторы связывают это с кислотно-основными свойствами фитиновой кислоты. Наличие в растворе электролитов препятствует связыванию белка с фитиновой кислотой, что объясняется, по-видимому, конкурентным связыванием фитиновой кислоты с ионами металлов. В целом, в статье приведены частные случаи взаимодействия фитиновой кислоты с конкретными белками. В настоящее время, не существует обобщенных данных о процессах комплексообразования фитиновой кислоты с протонированными белками и аминокислотами.

В работе [158] изучено взаимодействие биогенных аминов с фитат анионом в широком интервале рН и показана возможность образования прочно связанных комплексов. Свободная энергия Гиббса ($-\Delta G_0$), рассчитанная на одну протонированную аминогруппу равна $4,0 \pm 0,2$ кДж/моль, что характеризует, главным образом, нековалентное взаимодействие фитиновой кислоты с биогенными аминами. Авторами обсуждается вклад электростатических взаимодействий, водородных связей при образовании комплексов и прогнозируются зависимость прочности комплексов от заряда аниона.

Выводы по разделу 1.1

Фитиновая кислота обладает высокой анионной активностью и способна образовывать комплексные соединения с катионами металлов и положительно заряженными органическими лигандами, в частности, содержащими протонированные аминогруппы.

В литературе основное внимание уделено процессам комплексообразования фитиновой кислоты с металлами, причём и они не являются исчерпывающими и представлены довольно разрозненно.

1.2. Фармакологические свойства фитиновой кислоты и фитатов

В настоящее время активно изучаются эффекты влияния фитиновой кислоты на здоровье человека, существует ряд исследований, доказывающих широкий спектр её положительного терапевтического воздействия на организм человека.

1.2.1. Медико-биологические свойства, доказанные в клинической практике и в эксперименте

В ходе эпидемиологических исследований населения показано что люди, употребляющие в пищу продукты, богатые фитином (в основном, вегетарианцы) сравнительно реже подвержены ряду распространенных заболеваний, в том числе развитию опухолей, что, как предполагается, связано именно с эффектами фитиновой кислоты [111].

В таблице 1.1. представлены результаты исследований медико-биологических эффектов фитиновой кислоты.

Таблица 1.1.

Терапевтические эффекты фитиновой кислоты и фитатов.

Эффекты	Фармакологическое действие	Ссылка
Защита от рака толстой кишки	Синтезирует масляную кислоту путем ферментации и приводит к снижению рН среды кишечника и желчных кислот. Угнетает железоопосредованные окислительные реакции. Регулирует повышение экспрессии генов таких супрессоров опухолей, как p53, p21, WAF1/CIP1	[12, 69, 111, 129, 153]
Защита от карциномы молочной железы	Стимулирует апоптоз клеток рака молочной железы. Оказывает эффект на торможение клеточного деления	[78, 146, 172, 173]
Предупреждение гепатоцеллюлярной карциномы	Усиливает активность супрессоров гена опухолей. Способствует дифференциации злокачественных	[174, 175]

	клеток и их преобразованию в менее агрессивный фенотип	
Предупреждение рабдомиосаркомы (RMS)	Подавляет раковые клетки и индуцирует дифференцировку клеток	[171]
Предупреждение рака простаты (раковых клеток простаты PC3 и DU145)	Ослабляет рецептор-опосредованный (рецепторы фактора роста EGFR или erbB1) и жидкофазный эндоцитоз. Угнетает митогенные сигналы.	[183]
Предупреждение рака поджелудочной железы	Действует как адьютант для лечения рака поджелудочной железы и повышает чувствительность к общепринятым схемам лечения	[167]
Предупреждение рака крови и костного мозга	Увеличивает дифференциацию клеток карциномы. Увеличивает синтез гемоглобина	[153]
Снижение риска коронарной болезни сердца	Снижает уровень холестерина и триглицеридов в сыворотке. Уменьшает уровень сывороточного цинка и стабилизирует Cu^{2+}/Zn^{2+} соотношение. Уменьшает популяцию эритролейкемийных клеток K-562 и увеличивает синтез гемоглобина	[100, 108]
Гиполипидемическая активность	Снижает концентрацию общих печеночных липидов и триглицеридов, за счёт ингибирования печеночных ферментов, участвующих в липогенезе	[103]
Снижение частоты заболеваемости сахарным диабетом	Снижает уровень глюкозы в крови. Регулирует секрецию инсулина, влияя на активность кальциевых каналов	[55, 113, 181]
Влияние на кальциевый обмен	Антагонист кальция	[32, 97, 152]
Защита от кариеса	Снижает растворимость кальция фторида и фосфата – основных компонентов эмали. Показывает высокое сродство к гидроксапатиту и снижает деминерализацию	[104]
Защита от вируса иммунодефицита человека (ВИЧ)	Действует на ВИЧ и ВИЧ-специфический антиген на ранней стадии репликации	[136, 137]
Профилактика нефролитиаза	Стабилизирует скорость образования кристаллов (минеральных кислот и солей) в моче	[79, 83, 84]

1.2.2. Роль фитиновой кислоты как антиоксиданта в снижении оксидативного стресса

Фитиновая кислота является одним из наиболее эффективных природных антиоксидантов широкого спектра действия [51, 63, 81, 94, 115, 130, 131, 157]. В составе её антиоксидантного действия лежат несколько механизмов, в основе каждого из которых – уникальная способность фитиновой кислоты образовывать комплексы с положительно заряженными лигандами.

Свободно-радикальное окисление (СРО) липидов происходит в мембранах и липопротеиновых структурах всех тканей аэробных организмов, и является вырождено-разветвлённым цепным процессом. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) имеет большое значение в обновлении липидов мембран клеток и таким образом в поддержании структурного гомеостаза. Важной задачей является поддержание активности ПОЛ в организме на постоянном уровне, что в норме реализуется с помощью различных антиоксидантных систем. Недостаток поступления необходимых антиоксидантов приводит к развитию патологий, а одновременное воздействие внешних прооксидантов (радиация, ультрафиолет, гипероксия, загрязненный воздух и др.) и активация эндогенных механизмов генерации активных кислородных метаболитов (АКМ) приводит к напряжению антиоксидантной защиты и развитию окислительного стресса. Окислительный стресс проявляется на клеточном, тканевом и организменном уровнях и является важным патогенетическим фактором многих заболеваний [23, 89].

На сегодняшний день процессы ПОЛ хорошо изучены на разных экспериментальных системах. Весь процесс ПОЛ делят на стадии: зарождение цепей, развитие цепных реакций, их разветвление и обрыв. На начальной стадии зарождения цепей из валентно-насыщенных молекул липидов в биологических системах образуются свободные радикалы.

Зарождение цепей с образованием первичных радикалов R• может происходить под воздействием экзогенных физических или химических факторов, однако в ряде патологий катализирующие окисление радикалы имеют преимущественно эндогенное происхождение и возникают в результате активации ферментных радикалгенерирующих систем (табл. 1.2).

Таблица 1.2.

Ферментативные и неферментативные источники активных форм кислорода [22].

Ферментативные	<p style="text-align: center;"><i>Ксантиноксидаза</i> $\text{Гипоксантин} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Ксантин} + \text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}$</p> <p style="text-align: center;"><i>НАДФН-оксидаза</i> $\text{НАДФН} + \text{O}_2 \rightarrow \text{НАДФ}' + \text{O}_2^{\bullet-}$</p> <p style="text-align: center;"><i>Аминооксидазы</i> $\text{R-CH}_2\text{-NH}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{RO-CO} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$</p> <p style="text-align: center;"><i>Пероксидазы</i> Образование гипогалогенидов $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{X}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HOX} + \text{H}_2\text{O}$</p> <p style="text-align: center;"><i>НАД-оксидаза</i> $\text{E-Fe}^{3+} + \text{ROOH} \rightarrow \text{ROH} + \text{соединение I}$ $\text{соединение I} + \text{НАДН} \rightarrow \text{НАД} + \text{соединение II}$ $\text{соединение II} + \text{НАДН} \rightarrow \text{НАД} + \text{E-Fe}^{3+}$ $\text{НАД} + \text{O}_2 \rightarrow \text{НАД}^+ + \text{O}_2^{\bullet-}$</p> <p style="text-align: center;"><i>Альдегидоксидаза</i> $\text{R-CHO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{R-COOH} + \text{O}_2^{\bullet-}$</p> <p style="text-align: center;"><i>Дегидрооротатдегидрогеназа</i> $\text{Дигидрооротат} + \text{НАД} + \text{O}_2 \rightarrow \text{НАДН} + \text{O}_2^{\bullet-} + \text{оротовая кислота}$</p>
Неферментативные	<p style="text-align: center;">$\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-}$</p> <p style="text-align: center;">$\text{Hb-Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Hb-Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-}$</p> <p style="text-align: center;">Катехоламины + O₂ → Меланин + O₂^{•-}</p> <p style="text-align: center;"><i>Флавины в восстановленной форме</i> $\text{Лейкофлавин} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Флавиновый семихинон} + \text{O}_2^{\bullet-}$ $\text{Коэзим Q-убихинол} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Коэзим Q-убихинон} + \text{O}_2^{\bullet-}$ $\text{Тетрагидроптерин} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{Дигидроптерин} + 2\text{O}_2^{\bullet-}$</p>

Образующиеся в ферментных реакциях сравнительно малоактивные супероксидный анион-радикал, радикал оксид азота NO•, а также пероксид водорода H₂O₂, как правило, не способны непосредственно активировать

липопероксидацию, однако, в результате ряда последовательных реакций с участием ферментов и ионов металлов переменной валентности они могут давать начало высокореактивным радикалам, таким как, гидроксильный (ОН•) и прочим, обладающим энергией, достаточной для разрыва С–Н-связей и образования первичных липидных радикалов.

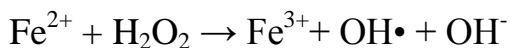
Экспериментально показано, что в качестве металлов с переменной валентностью могут выступать железо, медь, цинк, марганец, молибден, кобальт, титаний, комплексы никеля и ванадия [5, 54, 56, 89, 148, 155, 156, 161, 180].

Фитиновая кислота, как активный хелатор ионов металлов, способна ингибировать большинство металлоиницируемых реакций, лежащих в основе как ферментативного так и неферментативного процессов образования активных форм кислорода.

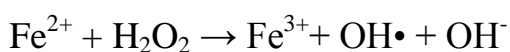
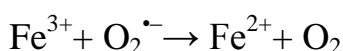
Так, высокая эффективность фитиновой кислоты доказана в отношении ингибирования как железо-, так и миоглобинзависимого ПОЛ [94, 130, 131]. Конкурентное связывание фитиновой кислоты с ионами железа и меди препятствует металл-зависимому распаду перекиси, в результате которого образуется ОН• [51, 130, 157] – наиболее токсичная из активных форм кислорода (АФК) – проявляет цитотоксическое и мутагенное действие:



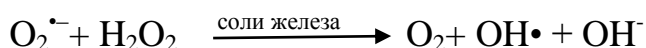
Взаимодействие двухвалентного железа с перекисью водорода составляет основу реакции Фентона:



При наличии в биологической среде H_2O_2 и $\text{O}_2^{\cdot-}$ реакция может протекать в две стадии (модифицированный вариант реакции Фентона[87])



Суммарная реакция:



В работах Abdelaziz S. (2009) и Khatiwada J. (2011) изучена и доказана роль фитиновой кислоты в ингибировании процессов ПОЛ и сопутствующих поражений клеток кишечника и печени [49, 106], а также в регулировании действий ферментов-металлопротеинов, наиболее изученным из которых является ксантиноксидаза [131].

Ксантиноксидаза – фермент, содержащий прочно связанное железо, не координированное с ядром гема [49, 131]. В последнее время, широко обсуждается вклад ксантиноксидазы в образование активных форм кислорода (АФК) при состояниях окислительного стресса. [61, 92, 96, 142, 145]. В нормальных условиях она существует преимущественно в форме ксантиндегидрогеназы, которая может обратимо и необратимо переходить в оксидазную форму. Этот переход обусловлен либо окислением дисульфидных связей с участием сульфгидрильных оксидаз, либо за счёт ограниченного протеолиза с участием кальций зависимых протеаз (рис.1.5)

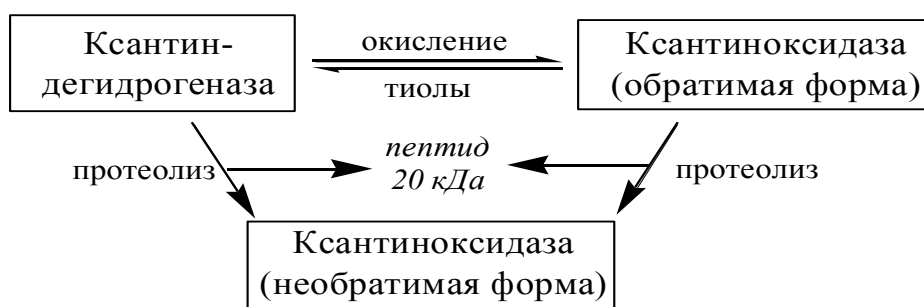


Рис.1.5. Процесс трансформации ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу [11].

Если ксантиндегидрогеназа используется в качестве акцептора электронов НАД⁺, то для оксидазной формы акцептором электронов является кислород, что сопряжено с генерацией АФК. При состояниях окислительного стресса, особенно протекающих в условиях гипоксии тканей, наблюдается быстрый процесс трансформации ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу (рис.1.6).

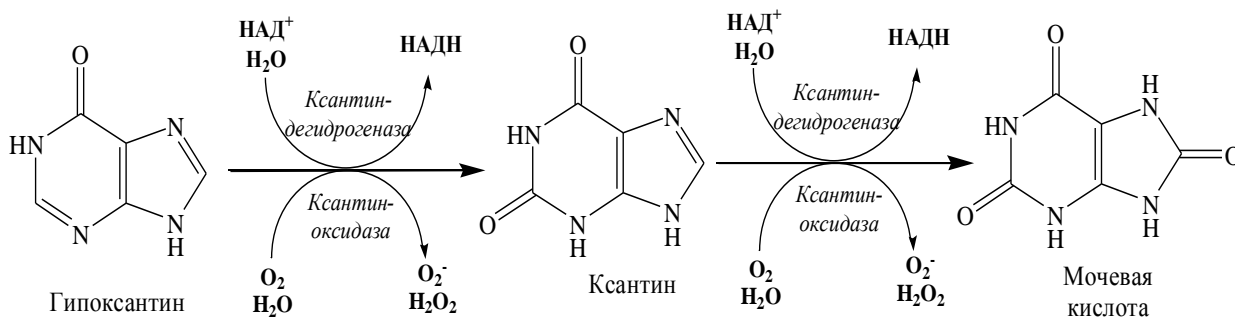


Рис. 1.6. Механизм действия ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы [22].

В оксидазной форме фермент участвует в образовании не только $O_2^{\cdot-}$, но и H_2O_2 , то есть в этом случае не исключена возможность двухэлектронного восстановления кислорода. Кроме того, по ходу ксантиноксидазной реакции наблюдается образование OH^{\cdot} , генерация которого сопряжена с восстановлением H_2O_2 .

Авторами работы [131] на гомогенате кишечника крыс установлено, что образование мочевой кислоты из ксантина и генерация супероксида ($O_2^{\cdot-}$) существенно тормозятся под действием 6 mM фитиновой кислоты. Кроме того, её антиоксидантный эффект усиливается за счёт активирования супероксиддисмутазы (СОД), способствующей переходу ксантиноксидазы в ксантиндегидрогеназу, не инициирующую перекисное окисление липидов.

В литературе содержатся данные многочисленных исследований подтверждающих действие фитиновой кислоты как антиоксиданта. Механизм её действия заключается, в основном в способности хелатировать ионы металлов, участвующие в процессах генерации перекисного окисления липидов. Активация некоторых ферментов (СОД) под действием фитиновой кислоты также способствует балансу про- и антиоксидантной системы в организме человека.

1.2.3. Метаболизм и биотрансформация фитиновой кислоты и её солей

Усвоение фитиновой кислоты живыми организмами зависит от индивидуальных особенностей пищеварительного тракта. Разделяют моно- и

полигастричных животных. У последних, в желудке содержатся ферменты фитазы и различные микроорганизмы, способные их продуцировать. Фитазы катализируют гидролитическое расщепление фитиновой кислоты и фитатов, с высвобождением фосфатов (рис. 1.7).

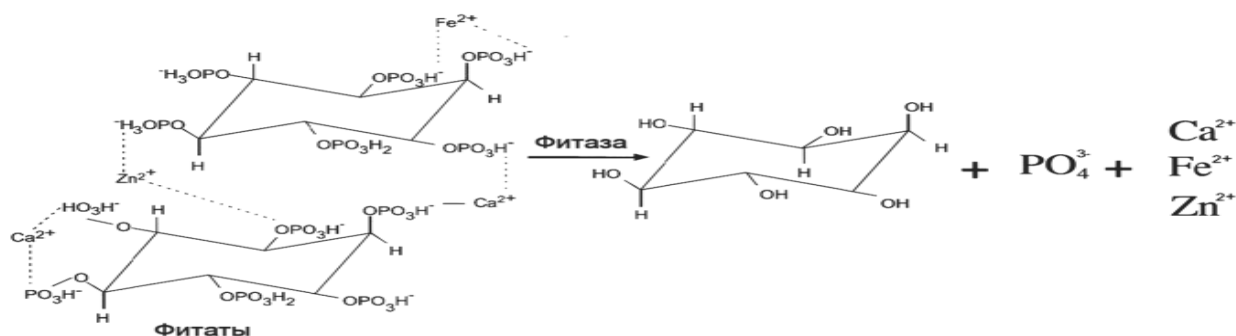


Рис. 1.7. Схема расщепление фитиновой кислоты и её солей под действием фермента фитазы [22].

Образованные продукты расщепления хорошо растворимы в соляной кислоте желудка и кишечном содержимом. Полученный инозитол подвергается изомеризации до глюкозы и практически полностью всасывается в тонком кишечнике. Соли фосфорной кислоты, в том числе и с органическими остатками, диссоциируют с образованием ионов металлов и свободных аминокислот.

Организмы с моногастричным ЖКТ, к которым относится и человек, не содержат подобных ферментов и практически не способны разрушать фитиновую кислоту. Трансформация фитиновой кислоты у них зависит от рН. Пищеварительная система моногастричных животных включает зоны как с низким рН (в желудке), так и нейтральным (в верхнем отделе тонкой кишки). При поступлении фитиновой кислоты и фитатов с пищей, по мере продвижения в ЖКТ, происходит процесс образования и разрушения комплексов, в которых фитиновая кислота выступает в роли полидентантного аниона [111]. В верхнем отделе тонкой кишки, где происходит максимальное поглощение катионов металлов, присутствие

нерастворимых комплексов фитатов металлов приводит к нарушению их всасываемости.

Так как формы, в которых многие металлы встречаются в продуктах питания (экзогенные металлы) и в желудочно-кишечном тракте (эндогенные металлы) точно не известны, довольно сложно предсказать характер специфических взаимодействий фитиновой кислоты и фитатов в желудочно-кишечном тракте, а также последствия этих взаимодействий, на усвоение других питательных веществ. На сегодняшний день вопрос о взаимодействиях фитатов с питательными веществами и металлами в желудочно-кишечном тракте человека изучены недостаточно.

В таблице 1.3. приведены предполагаемые механизмы взаимодействия фитиновой кислоты с веществами, поступающими с пищей и содержащимися в организме.

Таблица 1.3.

Наиболее вероятные взаимодействия фитиновой кислоты и её солей с органическими лигандами.

Органические лиганды	Предполагаемый механизм взаимодействия	Источники
Металлы (цинк, железо, кальций, магний, марганец, медь)	Образование нерастворимых фитатов – минеральных комплексов, что приводит к снижению биологической доступности металлов	[60, 99, 110, 122]
Углеводы	Образование фитат-углеводных комплексов, более стойких к разложению. Торможение каталитической активности амилазы. Комплексообразование с ионами Ca^{2+} способствует снижению деградации углеводов	[111, 116, 144, 152, 162]
Липиды	Формирование фитат-липидных комплексов, что приводит к образованию омыленных жиров в кишечнике и снижению концентрации жиров	[107, 111, 117]
Белки	Образование сложных конгломератов комплексов фитат-белок, не подвергающихся гидролизу протеолитическими ферментами	[65, 70, 74, 98, 111, 126]

Выводы по разделу 1.2

Фитиновая кислота обладает широким спектром полезных медико-биологических свойств, в основе которых лежит её выраженная реакционная способность к присоединению положительно заряженных молекул, а также влияние на металло-протеиновые комплексы в организме человека (например ферменты). Кроме того, большинство эффектов фитиновой кислоты связано с её способностью препятствовать окислительному стрессу и обеспечивать баланс про- и антиоксидантных систем организма.

Введение фитиновой кислоты в чистом виде в организм моногастричных животных (в том числе человека), исходя из процессов биотрансформации, нецелесообразно. Использование фитиновой кислоты как вещества медико-биологического значения требует проведения приёмов по повышению биодоступности соединения.

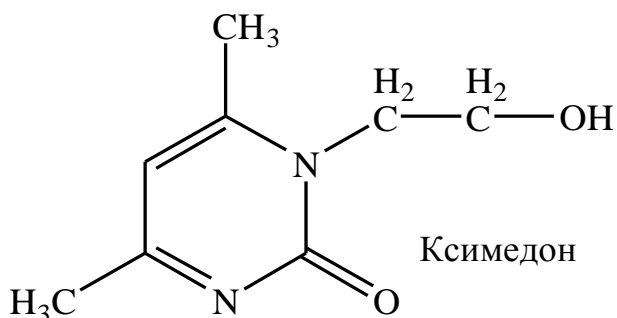
1.3. Физико-химические и фармакологические свойства аминов (ксимедона, глюкозамина и трисамина) как потенциальных компонентов солевых комплексов с фитиновой кислотой

С целью повышения биодоступности фитиновой кислоты нами предложено введение её в организм человека в виде соединений с биологически активными аминами – метаболитами широкого спектра действия, имеющими различное химическое строение – ксимедоном[®] (1-(β-оксиэтил)-4,6-диметил-1,2-дигидро-2-оксипиримидин) из классов оксопиримидинов, глюкозамином (2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозы гидрохлорид) – аминсахаров и триметамолом (трисамин, трис-оксиметил-аминометан) – алифатических аминов.

Физико-химические и фармакологические свойства ксимедона.

Ксимедон – 1-(β-оксиэтил)-4,6-диметил-1,2-дигидро-2-оксипиримидин относится к классу частично гидрированных производных пиримидина

(производное 3-го поколения) – производным урацила. Наиболее близким структурным аналогом ксимедона, среди лекарственных веществ этого класса, является 6-метилурацил и 5-метилурацил (тимин). С 1993 г. ксимедон как препарат внесен в Реестр лекарственных средств, разрешенных к применению в медицинской практике и производству [31].



Ксимедон представляет собой слабое органическое основание, которое способно присоединять протон и проявлять кислотные свойства. Рассчитанная pK_a для сопряженной ксимедону кислоты, равна 3,25 [27], что характеризует протонированную форму ксимедона как органическую кислоту средней силы (для примера, $pK_a(\text{CH}_3\text{COOH}) = 4,75$).

Квантово-химические расчеты [27] показывают, что при значения pH , близких к нейтральным, наиболее значимый отрицательный заряд находится на карбонильном атоме углерода (-0,470), при этом отрицательный заряд на азоте составляет -0,359 (Рис.1.8).

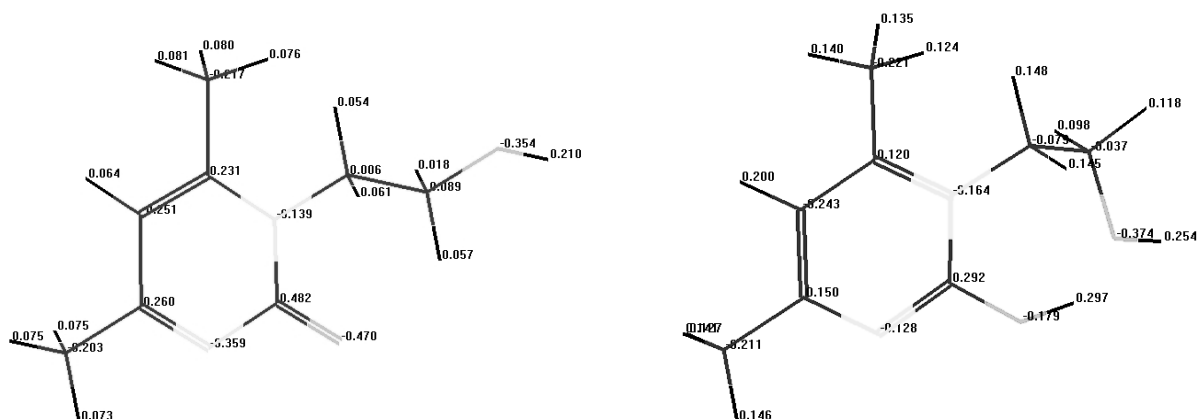
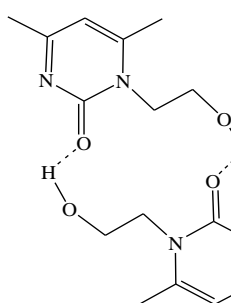


Рис.1.8. Квантово-химический расчет распределения зарядов в молекуле а) – ксимедона (I), б) – его протонированной формы (IV) [21].

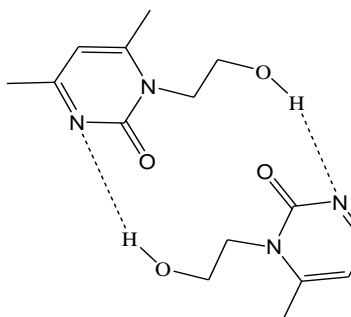
Это позволяет сделать вывод о том, что взаимодействие протона в кислой среде на первой стадии наиболее вероятно по кето-группе ксимедона (Рис.1.9).

Рис. 1.9. Возможные структуры протонированной формы ксимедона.

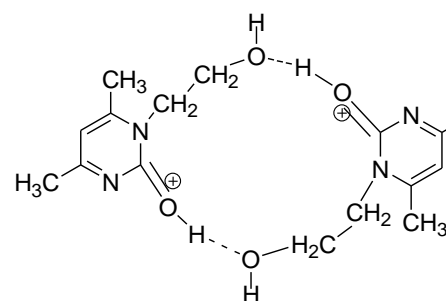
Протонированная форма ксимедона в водной среде обладает способностью к образованию циклических структур за счет водородных связей (внутри- и межмолекулярных водородных связей) типа:



VI



VII



VIII

Структура VI предположена авторами [21] на основании квантово-химических расчетов протонированной формы ксимедона, например структуры V (рис. 1.8, б). Устойчивость шести- и восьмичленных циклов доказана в ряде теоретических работ [50, 109].

В настоящее время накоплен многолетний опыт терапевтического использования ксимедона [1, 2, 6, 10, 14, 15, 17, 18, 29, 35, 36, 38, 39, 41, 45-47]. Удалось установить, что фармакологические эффекты препарата

реализуются как минимум несколькими путями. Ксимедон активирует аденилатциклазу, что приводит к быстрому накоплению циклического аденозинмонофосфата в клетке, следовательно, к стимуляции обменных процессов, в первую очередь биосинтеза белка [14, 15]. Препарат воздействует на процессы тканевого дыхания [41], перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной системы [6, 15], влияет на систему регуляции активного транспорта кальция в клетке [46]. Ксимедон обладает антимуtagenной активностью [1], оказывает действие на сульфгидрильный статус иммунокомпетентных клеток [18, 35, 47] и обладает антимикробным эффектом [2, 17, 18]. Подобное полиморфное влияние на ключевые биохимические процессы на клеточном и субклеточном уровнях обуславливает системность воздействия ксимедона на организм человека и обеспечивает уникальный клинический результат. К настоящему времени накоплены результаты многочисленных исследований по клиническому применению ксимедона в следующих областях: для профилактики и лечения осложнений в послеоперационном периоде, особенно у пациентов с высоким риском осложнений, и в неотложной абдоминальной хирургии [2, 14, 17, 18], в комплексном лечении длительно не заживающих ран и трофических язв [1, 13, 18], при хроническом остеомиелите [38, 39], в восстановительном периоде после травм периферических нервов [29], в комплексе лечения ожоговой болезни и перед аутодермопластикой [2, 18]. Препарат успешно применен в лечении пневмонии, хронического бронхита, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки [1, 14, 18], распространенных и деструктивных форм туберкулеза [2, 35], в стоматологии [1].

Физико-химические и фармакологические свойства глюкозамина гидрохлорида

В качестве биологически активного лиганда нами рассмотрен глюкозамин в виде его солевой – гидрохлоридной форме, так как имеются

экспериментально доказанные факты о способности хлорид-иона смещать стехиометрическое соотношение фитиновая кислота-лиганд до 1:6 [170, 178].

Основными химическими свойствами глюкозамина, определяющими фармакологическое действие его комплексов с фитиновой кислотой являются следующие [25]:

1. Полуацетальная гидроксильная группа способна при высаживании из комплекса с фитиновой кислотой образовывать пиранозиды.

Состав смеси может быть очень сложным, механизм реакции аналогичен кислотно-каталитическому синтезу гликозидов по Фишеру.

Возможно расщепление гликозидов – реакция гидролиза, протекающая в кислой среде (в щелочной среде гидролиз не проходит).

2. Обычно аминсахара, в том числе глюкозамин и его гликозиды, устойчивы к гидролизу за счёт протонированной NH_2 -группы. Положительный заряд затрудняет дальнейшее протонирование атома кислорода и дестабилизирует соответствующий гликозил-катион.

3. Взаимодействие глюкозамина с кислотами зависит от природы кислоты и условий протекания реакции. Так, с фосфорной кислотой, протонирование может протекать как по аномерному спиртовому гидроксилу с образованием простого эфира, так и по NH-группе:

В организме человека сахара обычно фосфорилируются по спиртовым группам.

Глюкозамин вырабатывается хрящевой тканью суставов и играет значимую роль как предшественник гликозилированных белков и липидов при биохимическом синтезе, а также непосредственно входит в состав синовиальной жидкости. В организме, глюкозамин трансформируется в гликозаминогликаны (вещества, которые являются основными компонентами суставных хрящей), поэтому его применяют в основном как препарат для профилактики (восполнение эндогенного глюкозамина) и лечения заболеваний костной и соединительной ткани.

Имеются данные о способности глюкозамина снижать сосудорасширяющее действие интерлейкина (ИЛ)-1 [151]. В многочисленных исследованиях фармакологических эффектов глюкозамина установлено его благоприятное влияние на метаболизм хряща — усиление анаболических и ослабление катаболических процессов. Так, многолетняя практика показала положительную роль глюкозамина в уменьшении деградации коллагена хряща, развивающейся в результате избыточной перекисидации липидов и окисления белков [75, 163].

Кроме того, имеются сведения о том, что препараты глюкозамина способны ингибировать процессы образования малонового диальдегида и

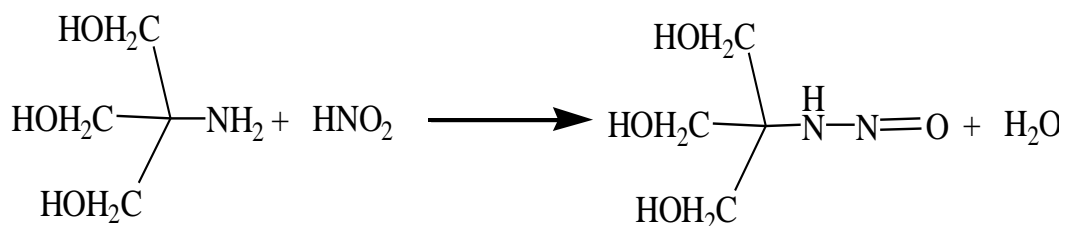
диеновых конъюгатов – веществ, лежащих в основе нарушения биохимических и биофизических свойств хрящевого матрикса и образующихся на промежуточных этапах окисления коллагена [164]. Как правило, препараты используются в сочетании с хондроитином, способствуя повышению активности антиоксидантных ферментов, таких как СОД и каталаза [159].

Физико-химические и фармакологические свойства трисамина

В качестве амина, обладающего выраженными основными свойствами в нашей работе выступает трисамин.

Трис имеет pK_a 8,06 и эффективен в качестве буфера при рН от 7,0 до 9,2 [77].

Для трисамина характерны все реакции алифатических аминов – взаимодействие с кислотами, алкилирование галогеналканами с образованием, ацилирование с ангидридами и галогенангидридами с образованием амидов. Реакция с азотистой кислотой (диазотирование) лежит в основе количественного определения трисамина.



Применение трисамина в медицине основано на его буферных свойствах [31]. Водный раствор трисамина имеет щелочную реакцию, а водный раствор с концентрацией 3,66 % изоосмотичен плазме крови (рН 10,2 - 10,7) [20]. При внутривенном введении трисамин увеличивает щелочной резерв крови и устраняет ацидоз за счёт снижения концентрации ионов водорода благодаря протонированию трисамина без образования побочных продуктов как в

случае использования гидрокарбоната натрия (препарат-аналог) [101]. В виду этого, использование трисамина более предпочтительно при острых и хронических заболеваниях и процедурах, сопровождающихся метаболическим и смешанным ацидозом (шок, массивные переливания крови, экстракорпоральное кровообращение, ожоги, перитонит, острый панкреатит и др.). Трисамин интенсивно применяют во время реанимации и в постреанимационном периоде для быстрого устранения ацидоза [20].

Кроме того, трисамин является антацидом системного действия и применяется при отравлениях салицилатами и снотворными средствами – производными барбитуровой кислоты, так как осмодиуретическое влияние и ощелачивание мочи способствуют удалению из организма слабых кислот [20, 31].

Выводы по разделу 1.3

Для повышения биодоступности фитиновой кислоты целесообразно получать комплексы с протонированными биогенными аминами или с лекарственными веществами-метаболикками широкого спектра действия из класса аминов.

Выбор аминов обусловлен физико-химическими и фармакологическими свойствами аминов. Ксимедон, способный протонироваться и образовывать сопряженную кислоту, проявляет антиоксидантные, противовоспалительные и репаративные свойства, которые позволяют широко использовать его как иммуномодулятор, репаратант и регенерант.

Глюкозамин в виде гидрохлорида (протонированная форма амина) способствует уменьшению деградации коллагена хряща, развивающейся в результате избыточной пероксидации липидов и окисления белков.

Трисамин, обладающий буферными свойствами и изоосмотичный плазме крови, способен проникать через клеточные мембраны, и устранять внутриклеточный ацидоз.

1.4. Методы анализа фитиновой кислоты, аминов и комплексов

1.4.1. Известные методы качественного и количественного определения фитиновой кислоты

Методы определения фитиновой кислоты основаны на её способности активно хелатировать различные ионы с образованием осадков и цветных продуктов.

Цветные реакции с комплексами железа

Определение фитиновой кислоты основано на её способности конкурентно связывать ионы металлов в составе окрашенных комплексов, в следствие чего их окраска ослабевает. Таким образом, по снижению оптической плотности комплекса можно определить присутствие и количественное содержание фитиновой кислоты [64, 68, 71, 76, 93, 114, 125, 127, 160, 179].

Чаще всего, в качестве реагентов (табл. 1.5) в таком анализе используют комплексы железа (III) – реактив Вэйда (железо(III)-сульфосалициловая кислота) [68, 114, 179], железо(III)-тиоцианатный комплекс [76, 160], а также YCl_3 -PAR (комплекс иттрия (III) хлорида с 4-(2-пиридилазо)резорцином) [64, 93, 125, 127].

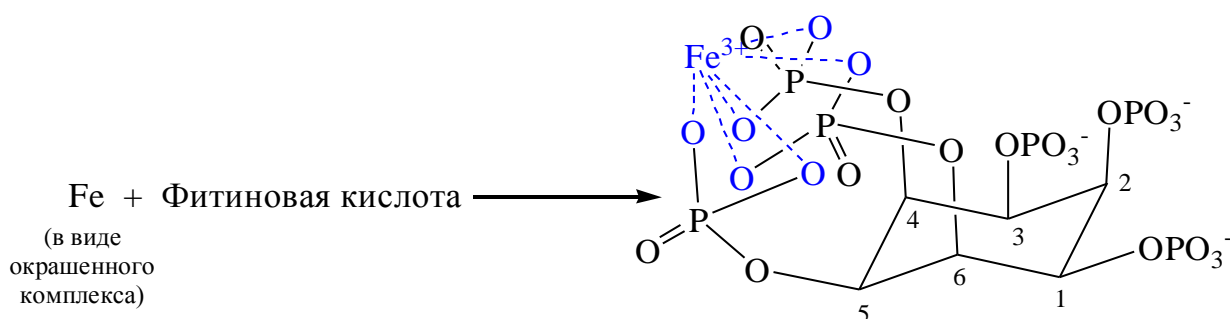


Схема 1.1. Взаимодействие фитиновой кислоты с железом в составе комплексов железа [133].

Таблица 1.4.

Цветные реакции вытеснения железа из железо-содержащих органических комплексов фитиновой кислотой, лежащие в основе спектральных методов её определения.

Ссылка	Реагент	Цвет	pH	λ_{\max} , нм	Примечания (метод улавливания)
[19, 68, 114, 179]	Реактив Вэйда (железа-сульфосалицилатный комплекс)	фиолетово-розовый	1,8-2,5 [FeSal] ⁺	510	UV-vis, ВЭЖХ,
		красно-бурый	4~8 [Fe(Sal) ₂] ⁻	580	
		желтый	8-12 [Fe(Sal) ₃] ³⁻	416	
[19, 30, 76, 160]	Железа-тиоцианатный комплекс [Fe(NCS) _n (H ₂ O) _{6-n}] ₃	красный	До 4	480	Визуальный, UV-Vis, ВЭЖХ
[19, 26, 30]	Железо-катехольный комплекс	фиолетовый	6~7	560-580	Визуальный, UV-Vis, модель антиоксидантного действия
[26, 43, 44]	Комплекс Fe(II) с 1,10-фенантролином (о-фенантролин-железо (II) сульфат)	Восстановленная форма индикатора темно-красная, окисленная – бледно-голубая	не зависит от величины pH в интервале от 2 до 9	при $\epsilon = 1,06 \cdot 10^4$ 490 нм, при $\epsilon = 1,1 \cdot 10^4$ 505 нм	Визуальный, UV-Vis, ВЭЖХ
[43]	Комплекс Fe(II) с 2,2'-бипиридином [Fe(bipy) ₃] ²⁺	красный	3,6	520	Визуальный,

Анализ на общий фосфор

Количественное содержание фитиновой кислоты можно оценить с помощью анализа на содержание общего фосфора. Для этого фитиновую кислоту первоначально гидролизуют до образования простых фосфатов окислительной смесью азотной и хлорной кислот. Полученный раствор анализируют различными методами, один из которых – фотометрирование комплекса молибденованадатных гетерополикислот при длине волны $\lambda_{\max} = 425$ нм [3, 158]. Полученный раствор также можно анализировать с помощью метода ИСП (ионизации в индуктивно-связанной плазме) [53, 64, 71, 138] или атомно-абсорбционной спектрофотометрии. Известен метод определения фосфора в составе фитиновой кислоты (метод Мишель-Дюрана), в котором фитиновая кислота осаждается в виде кальциевой соли и анализируется гравиметрически [64].

³¹P-ЯМР

³¹P-ЯМР анализ позволяет одновременно количественно определить четыре стереоизомера фитиновой кислоты (рис. 1.10). В работе В.Л. Turner (2012) исследовано содержание фитиновой кислоты в виде нео- и D-хиро-инозитгексакис фосфатов (IP₆) в пробах окружающей среды [168].

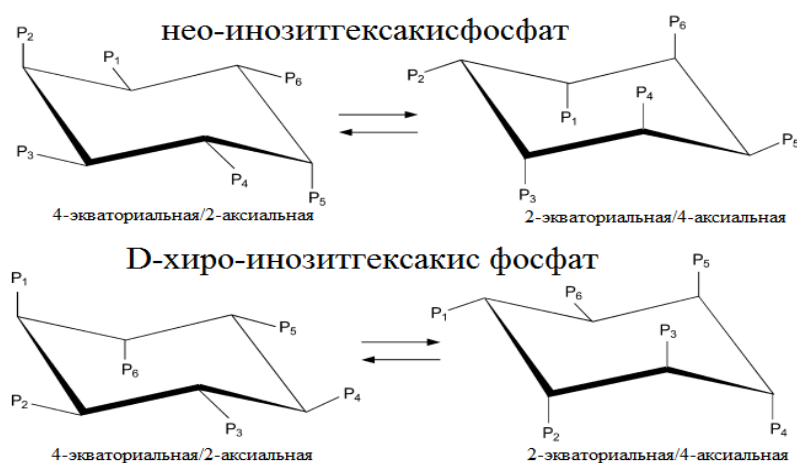


Рис.1.10. Конформационные изменения нео- и D-хиро-инозитгексакис фосфатов (IP₆) в зависимости от pH раствора.

При низких значениях pH IP_6 принимает 4-экваториальную/2-аксиальную конформацию. При высоких – 2-экваториальную/4-аксиальную. Конформации находятся в равновесии и их относительные пропорции могут зависеть от других факторов (например, наличия металлов-противоионов).

В ^{31}P -ЯМР спектрах исследуемых форм IP_6 имеются характерные сигналы, аналогичные сигналам слабого поля ортофосфатов в области с $\delta = 6,40$ м.д. до $\delta = 6,70$ м.д., которые можно обнаружить даже при относительно низких концентрациях с хорошей разрешенностью [118]. Для мио-конформации сигналы обнаруживаются в области с $\delta = 4,38$ м.д. до $\delta = 5,79$ м.д.

В работе М. Sala (2011) изучено влияние заместителя (иона железа) на смещение основных сигналов ^{31}P -ЯМР спектров фитиновой кислоты. Показано, что большее замещение фитиновой кислоты лигандом сдвигает область сигналов ^{31}P -ЯМР спектра в более сильное поле [147].

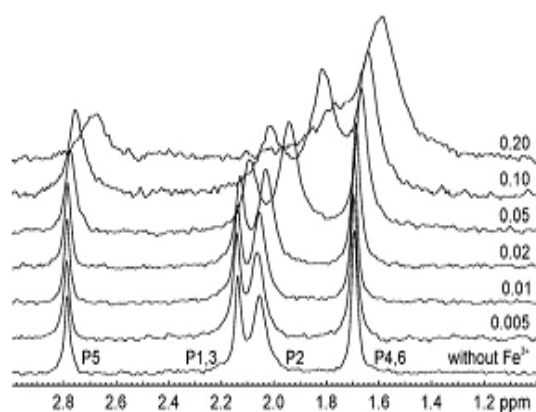


Рис. 1.11. Сдвиг сигналов ^{31}P -ЯМР спектра $InsP_6$ при увеличении $Fe(III)-InsP_6$ молярного соотношения от 0,005 до 0,20. Нижний спектр соответствует фитиновой кислоте в мио-конформации.

Другие современные физико-химические методы

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Для анализа фитиновой кислоты используются различные методы ВЭЖ-хроматографии.

В работе Н.-Р. Park (2006) описан метод определения фитиновой кислоты в составе детского питания [138] (рис. 1.12). Содержание компонента определяли на ВЭЖ-хроматографе с RI-детектором (детектор показателя

преломления) и колонкой с обращено-фазовым режимом. В качестве подвижной фазы использовался раствор KH_2PO_4 (pH 6,0).

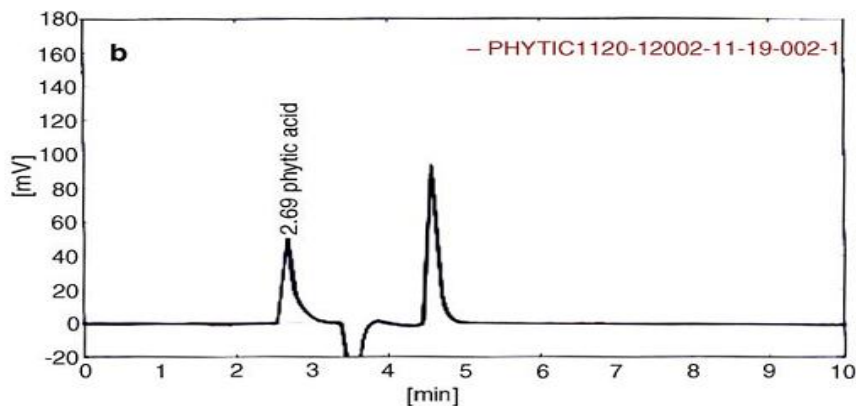


Рис.1.12. Хроматограмма стандарта фитиновой кислоты (InsP_6), полученная на ВЭЖХ-RI.

R. Amaro, для анализа фитиновой кислоты в биологических системах также использует ВЭЖ-хроматограф с RI-детектором (детектор показателя преломления) и колонку с обращено-фазовым режимом, однако в качестве подвижной фазы («С») предлагается использовать раствор, представляющий собой смесь тетраэтиламмония хлорид, метанола и муравьиной кислоты [53]. Использование этой подвижной фазы, как сообщается, позволяет сократить время анализа до 18 минут и получить разрешенные пики для гекса-, пента-, тетра-, три- и дифосфат мио-инозитов (рис.1.13).

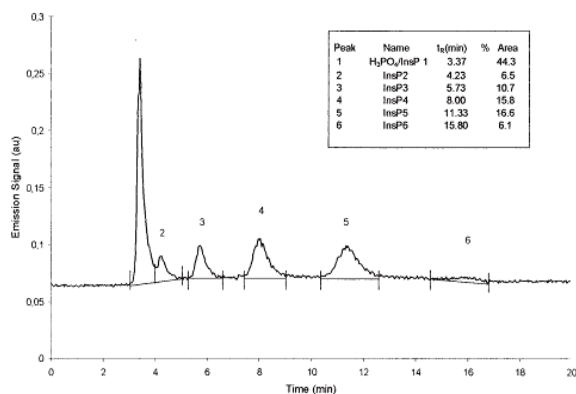


Рис.1.13. Хроматограмма продуктов гидролиза фитиновой кислоты, снятая в течение 18 мин при $t = 95^\circ\text{C}$, с подвижной фазой «С».

Dost K. (2006) предлагает использовать ВЭЖ-хроматограф с UV/vis-детектором (ультрафиолетовый детектор) и колонкой с обращено-фазовым режимом [76]. Для этого предварительно проводят цветную реакцию, лежащую в основе хроматографического определения фитиновой кислоты с железом(III)-тиоцианатным комплексом.

В качестве подвижной фазы использовали смесь 30% ацетонитрила в воде, подкисленной 0,1М HNO₃. Пик железа(III)-тиоцианатного комплекса анализируют при длине волны 460 нм (рис.1.14).

Концентрация фитиновой кислоты в этом случае рассчитывается с помощью калибровочной кривой.

Подобным образом, в качестве окрашенного реагента, образующего комплексы с фитиновой кислотой, могут использоваться сложные комплексы железа(III), такие как железо-катехольный комплекс или реактив Вэйда.

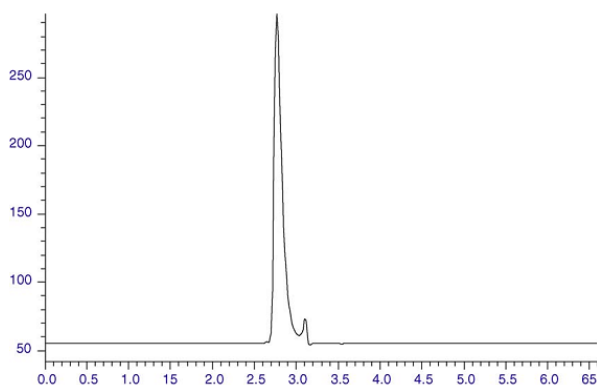


Рис.1.14. Хроматограмма железа (III)-тиоцианатного комплекса.

Отдельно выделяют метод высокоэффективной ионной хроматографии, т.к. его используют не столько для анализа фитиновой кислоты, сколько для качественного и количественного определения продуктов её гидролиза.

Работы Q.-Ch. Chen (2003, 2004) посвящены количественному определению содержания гекса-, пента-, тетра-, три- и дифосфат миоинозитов, в том числе и в составе пищевых продуктов [64].

В исследовании использовали ВЭЖХ с масс-селективным детектором и анионообменными колонками с подвижной фазой в виде раствора,

состоящего из раствора NaOH, воды и 50% изопропанола (об/об = 55:41:4 соответственно).

Полученные пики раствора проб сравнивали с ранее полученными пиками для стандартных растворов гекса-, пента-, тетра-, три- и дифосфат мио-инозитов (рис. 1.15, 1.16).

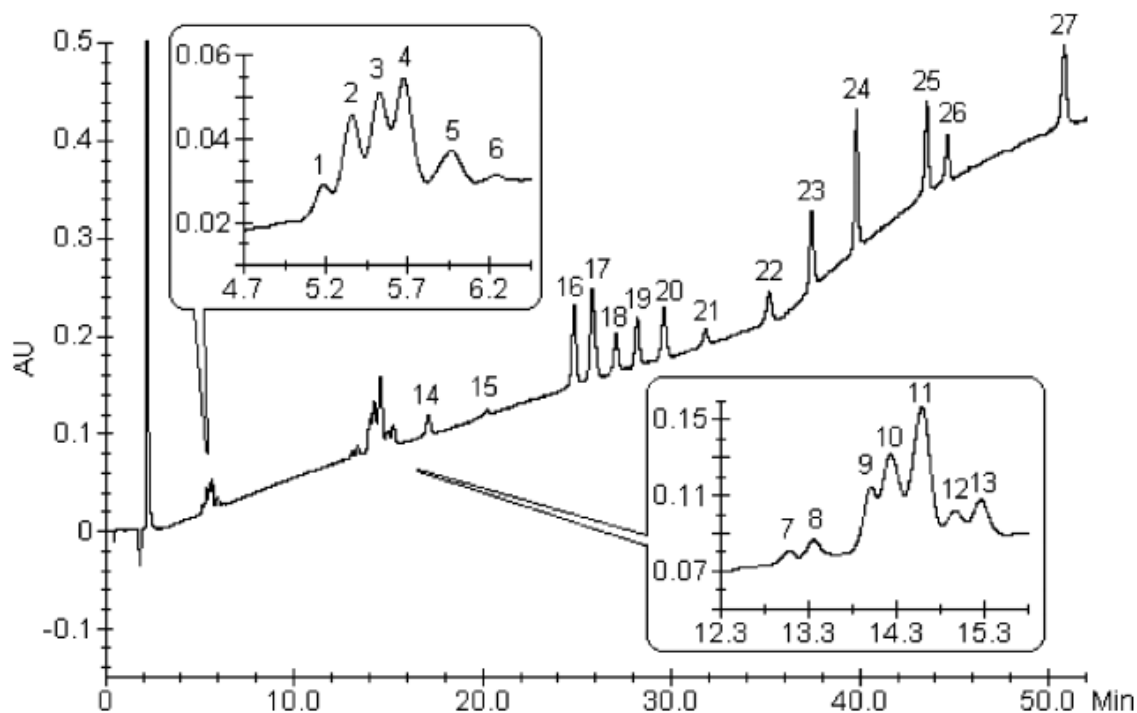


Рис.1.15. Хроматограмма стандартных растворов. DL – неразделённые энантиомерные пики. Цифровые обозначения:

1	Ins(1,3)P ₂	8	Ins(2,4,6)P ₃	15	Ins(4,5,6)P ₃	22	DL-Ins(1,4,5,6)P ₄
2	DL-Ins(3,4)P ₂ DL-Ins(1,5)P ₂	9	DL-Ins(1,3,4)P ₃	16	DL- Ins(1,2,4,6)P ₄ , Ins-(1,2,3,5)P ₄	23	Ins(1,2,3,4,6)P ₅
3	DL-Ins(1,2)P ₂	10	DL-Ins(1,2,4)P ₃ , DL-Ins(2,3,5)P ₃	17	DL- Ins(1,2,3,4)P ₄ , Ins(1,3,4,6)P ₄	24	DL- Ins(1,2,3,4,5)P ₅
4	DL-Ins-(2,4)P ₂ DL-Ins(1,4)P ₂	11	Ins(1,2,3)P ₃ , DL-Ins(1,2,6)P ₃ , DL-Ins(1,4,6)P ₃	18	DL- Ins(1,2,4,5)P ₄	25	DL- Ins(1,2,4,5,6)P ₅
5	DL-Ins(4,5)P ₂ Ins(2,5)P ₂	12	DL-Ins(1,4,5)P ₃	19	DL- Ins(1,3,4,5)P ₄	26	Ins(1,3,4,5,6)P ₅
6	Ins(4,6)P ₂	13	DL-Ins(2,4,5)P ₃	20	DL- Ins(1,2,5,6)P ₄	27	InsP₆
7	Ins(1,3,5)P ₃	14	DL-Ins(1,5,6)P ₃	21	Ins(2,4,5,6)P ₄		

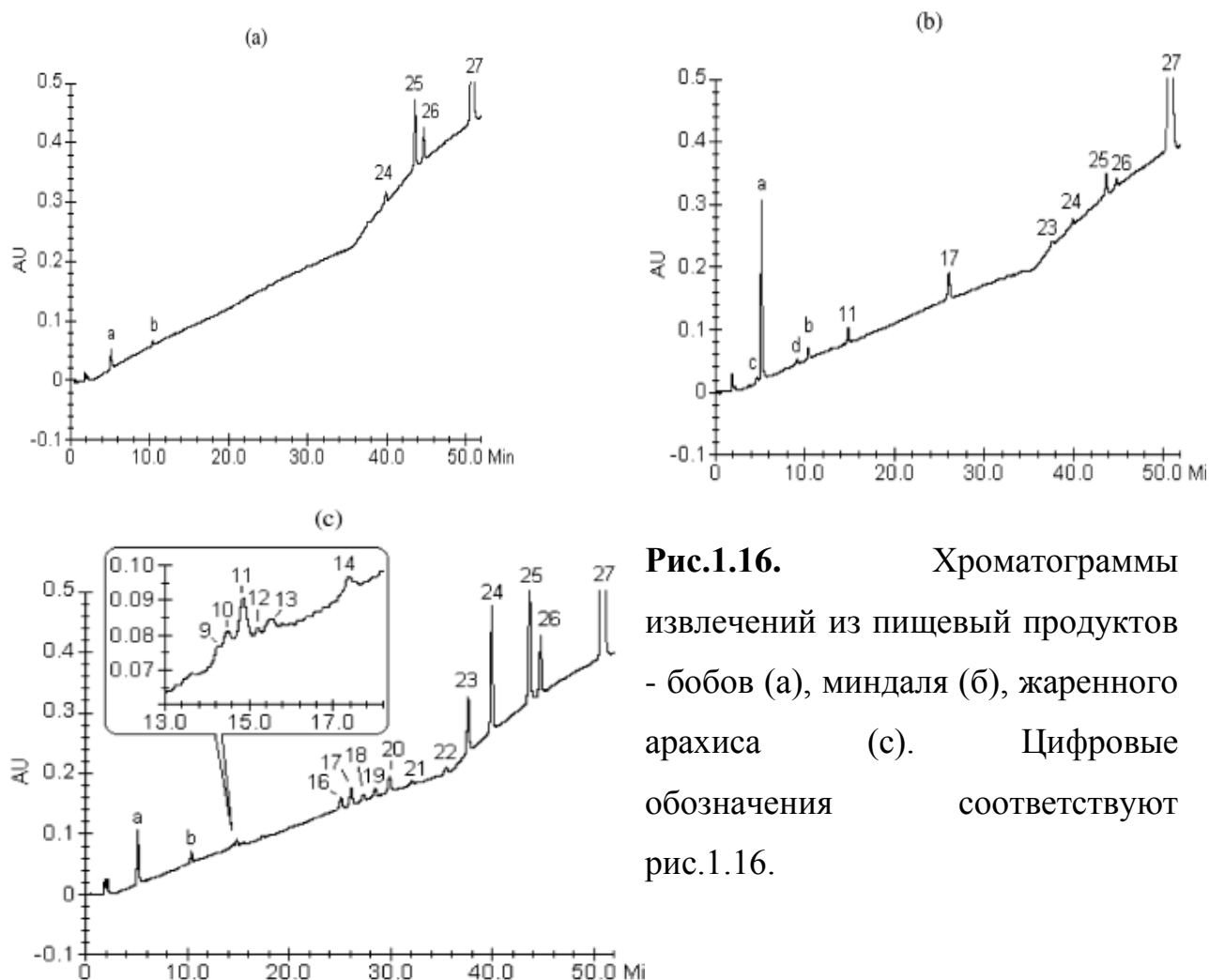


Рис.1.16. Хроматограммы извлечений из пищевой продукты - бобов (а), миндаля (б), жаренного арахиса (с). Цифровые обозначения соответствуют рис.1.16.

1.4.2. Методы анализа аминов (ксимедона, глюкозамина и трисамина)

Анализ ксимедона

Подлинность ксимедона устанавливают методами ИК- и УФ спектроскопии, а также качественной реакцией с перманганатом калия в щелочной среде с образованием голубовато-зелёного быстроисчезающего окрашивания [42]. ИК спектр 1% раствор ксимедона снимают в хлороформе в кювете из натрия хлорида с толщиной слоя 0,2 мм, в области от 4000 до 400 см⁻¹ и делают вывод о подлинности соединения при полном совпадении полос поглощения с полосами поглощения спектра стандартной субстанции ксимедона. УФ спектр раствора ксимедона, снятый относительно 0,1М

раствора хлористоводородной кислоты в кювете с толщиной слоя 10мм, в области от 250 до 350 нм должен иметь максимум поглощения при 308 ± 2 нм.

Определение ксимедона также проводится методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором. Качественный анализ проводят по сопоставлению времени удерживания стандартных образцов одновременно с его количественным определением [18].

Для количественного анализа готовят серию стандартных растворов и испытуемый. По результатам анализа стандартных растворов строят калибровочную прямую зависимости концентрации от площади пика, по которой находят концентрацию испытуемого раствора (рис. 1.17).

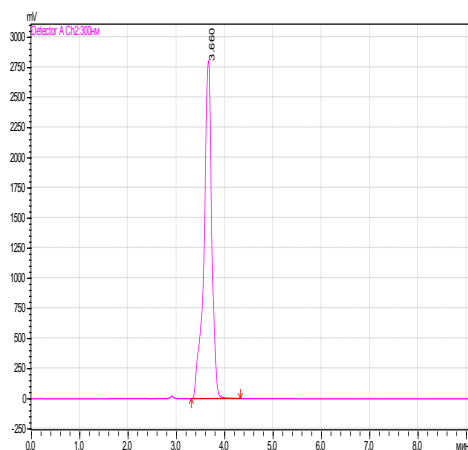


Рис.1.17. Хроматограмма стандартного раствора ксимедона [42].

Анализ глюкозамина

В основе определения глюкозамина лежат реакции его расщепления с последующей стадией анализа полученных продуктов. В методе Элсона-Моргана это реакция превращения глюкозамина в производные пиррола с последующей обработкой реагентом Эрлиха в присутствии спирта (стабильное красное окрашивание) и фотоколориметрированием [52]. При этом основным хромогеном является 2-метилпиррол. Этот метод, с использованием реакции образования стабильно окрашенного соединения используется для количественного определения глюкозамина.

В методе Дише хромогенами являются 2,5-ангидро-D-манноза, образующиеся при дезаминировании глюкозамина под действием HNO_2 [43].

Обработка продукта индолом (или пирролом) в присутствии соляной кислоты даёт розовое окрашивание.

Надо заметить, что настоящая реакция не является специфичной для глюкозамина и все гексозамины (глюкозамин, мурамовая кислота, галактозамин) реагируют как с реактивом Эрлиха, так и по методу Дише с образованием почти идентично окрашенных продуктов. Однако это имеет большое значение в основном в анализе биологических структур, содержащих смесь гексозаминов [8]. В случае необходимости разделения, используют ионообменную смолу.

Реакции с образованием окрашенных продуктов лежат в основе определения глюкозамина гидрохлорида методами ВЭЖ хроматографии с использованием УФ-детектора [119, 128]. При этом при пробоподготовке с помощью ионообменной смолы дополнительно избавляются от хлорид ионов [128]. Глюкозамин в форме гидрохлорида также определяют по хлорид иону.

Анализ трисамина

Трисамин является представителем алифатических аминов, в связи с чем, для определения трисамина удобно использовать нингидриновую или биуретовую реакции, с последующей спектрофотометрией полученного окрашенного соединения [8, 28, 43], а также реакции diazotирования и азосочетания, лежащие в основе титриметрических методов [24].

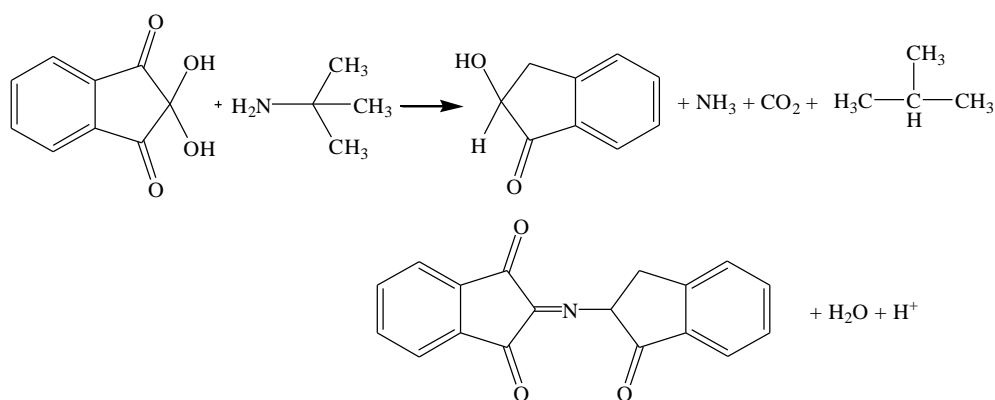


Схема 1.2. Реакция взаимодействия трисамина с нингидрином.

Выводы по разделу 1.4

В основе большинства методов определения фитиновой кислоты лежит её способность реагировать с ионом железа и вытеснять его из его окрашенных соединений.

Выбранные лиганды – амины-метаболик широкого спектра действия определяются, в основном, спектрофотометрически, после перевода аминов в окрашенные соединения. При этом, существующие методики обладают относительной специфичностью.

ГЛАВА 2. Объекты, методы и аналитические методики исследования.

2.1. Материалы и приборы

- *Субстанция «Инозитгексафосфорная кислота»* (Inositol hexaphosphoric acid, 40-50 wt% aqueous solution), «Acros organics», флакон темного стекла на 250 мл. Содержание инозитгексафосфорной кислоты – 50%; *Ксимедон* (1-(β-оксиэтил)-4,6-диметил-1,2-дигидро-2-оксопиримидин), НПП ФГУП «Кристалл», г. Дзержинск Нижегородской области; *Глюкозамина гидрохлорид* (Glucosamine hydrochloride), «WIRUDGMBH». Содержание глюкозамина гидрохлорида не менее 99% (ФСП 42–0314–1478 – 01); *Трис-(оксиметил)-аминометан* (Tris-(hydroxymethyl) aminomethane) («Ч», ТУ 6-09-4292-76); *Кислота сульфосалициловая* («Ч», ГОСТ 4478-78); *Хлорид железа шестиводный* $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ГОСТ 4147-74); *Натрия гиалуронат* (порошок из стекловидного тела быка, 99,8%, 1,63 MDa, CPN Spol.s.r.o, The CzechRepublic; «Sigma», Product Number: H7630); *Аммония ванадат мета* («ХЧ», ГОСТ 9336-75); *Аммоний молибденовокислый* («ХЧ», ГОСТ 2677-78); *Кислота азотная* («ХЧ», ГОСТ 4461-77); *Кислота хлорная* («ХЧ», ТУ 6-09-2878-84); *Калий фосфорнокислый однозамещённый* (калий дигидрофосфат, KH_2PO_4 , ТУ 2186-001-57904307-02, ООО «Альфахим», г. Санкт-Петербург); *Метилпарабен* (метил-4-гидроксибензоат, $\geq 99.0\%$ (GC), Ueno Fine Chemicals Industry, Индия; «Sigma-Aldrich», Product Number: 54750); *Этанол* (медицинский, 95%, ООО «Гиппократ», г. Самара); *Изопропанол* («ХЧ», ГОСТ 9805-84); *Ацетонитрил* (сорт 0, НПК «Криохром»); *Вода очищенная*, (ФС 42-0324-09), полученная на установке системы очистки воды Elix 3 с картриджем Progard (Millipore, Франция), удельное сопротивление менее 0,2 $\mu\text{См}$.

- **Приборы:** *Электронные спектры поглощения* были получены на приборе «Bio line Specord S-100» (Analytik Jena, Germany) в области 190-600 нм, толщина кварцевой кюветы 10 мм. *ИК-спектры* были сняты на ИК-спектрофотометре с преобразователем Фурье «IR Prestige-21» (Shimadzu,

Japan) в области 4000-500 см⁻¹ в виде смесей с калием бромидом при концентрации изучаемых веществ в смеси 0,1-0,3%. ВЭЖ-хроматограммы были получены с использованием хроматографической системы: ВЭЖ-хроматограф «LC-10Avp» (Shimadzu, Japan) в обращено-фазовом режиме с дегазатором подвижной фазы, термостатом колонки и UV-Vis-детектированием. колонка Discovery C18 (25 смx4.6 mm, 5 μm, Supelco). Объем вводимой пробы – 20 мкл. Потенциометрическое титрование проводили на электронном стационарном рН-метре «рН-150М» фирмы РУП (Гомельский завод измерительных приборов, Белоруссия). В процессе титрования также использовали мешалку магнитную ММ-5 (ПО “Закарпатприбор”, Завод комплектных лабораторий, соответствует ТУ25-11.834-80). Спектры ЯМР ¹³C и ¹H регистрировали на ЯМР-спектрометре AgilentDD2 400 (Agilent Technologies, США) в D₂O на рабочей частоте 101 и 400 МГц соответственно; Спектры ³¹P-ЯМР регистрировали на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker AM500 (Bruker Daltonik GmbH, Германия) в D₂O на рабочей частоте 202,46 МГц. Элементный анализ на содержание С, Н, N , проводили на анализаторе «VarioMICRO» (Elementar Analysen systeme GmbH, Германия); Лабораторные электронные аналитические весы «KERN 770-13» с d = 0,0001 г, Max 120 г и KERN 440-33» с d = 0,01 г, Max 200 г. (KERN & Sohn GmbH, Germany) Центрифуга «СМ-6 (RPM×1000)» (ELMI, Latvia). Фильтр Шотта соответствует ГОСТ 25336-82.

2.2. Аналитические методики определения фитиновой кислоты, аминов (ксимедона, глюкозамина, трисамина) и их солевых комплексов.

2.2.1. Количественное определение фитиновой кислоты в комплексах и свободном виде по содержанию общего фосфора.

Первоначально фитиновую кислоту или комплекс подвергали «мокрой» минерализации смесью концентрированных азотной и хлорной кислот. Образующиеся фосфат-ионы определяли спектрофотометрически с длиной волны 425 нм после реакции раствором реагента (смесь аммония

метаванадата и аммония молибдата) с образованием интенсивно-желтых производных гетерополикислот. Смесь кислот для минерализации готовили непосредственно перед анализом, смешивая в соотношении 1:1 кислоту азотную концентрированную и кислоту хлорную (хч) в конической колбе на 25 мл. Раствор реагентов получали последовательным смешением равных количеств кислоты азотной разведенной (1 ч. азотной кислоты и 2 ч. воды), растворов аммония ванадата и аммония молибдата. Раствор аммония ванадата: в колбу на 1 л помещали 2,5 г аммония метаванадата (NH_4VO_3) и растворяли в 500 мл воды, доведенной до кипения. После охлаждения добавляли 20 мл кислоты азотной концентрированной и доводили до метки водой очищенной. Раствор аммония молибдата: в колбу на 1 л помещали 50 г аммония молибдата и растворяли в 800 мл воды при температуре около 50 °С и после охлаждения доводили до метки водой очищенной.

Раствор реагентов должен быть полностью прозрачен и слегка желтоватым. Использовали свежеприготовленным.

Методика: В мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 0,3 – 0,4 г 50%-ого раствора фитиновой кислоты или 0,7-0,8 г твёрдого комплекса, доводили водой до метки. 2 мл полученного раствора помещали в коническую колбу вместимостью 25 мл и упаривали на песчаной бане (при этом избегали полного выпаривания). Затем приливали 2 мл смеси кислот для минерализации и нагревали при температуре 180-240 °С в течение 1 ч. на песчаной бане. Коническую колбу во время нагревания накрывали воронкой.. После охлаждения до комнатной температуры полученный раствор количественно переносили в мерную колбу на 100 мл 45-ю мл воды 100 мл и доводили уровень рН раствора до 7 аммиаком водным (около 1 мл аммиака водного) по универсальной индикаторной бумаге. К получившемуся раствору добавляли 50 мл раствора реагента и доводили до метки водой очищенной. Раствор тщательно перемешивали и помещали на 30 мин в темное место, после чего фиксировали значение оптической плотности полученного раствора на спектрофотометре при максимуме поглощения 425

нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения использовали контрольный образец, приготовленный аналогично пробе с 1 мл смеси кислот для минерализации.

Содержание фосфора в граммах в образце вычисляли по формуле:

$$P = \frac{D \cdot F \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 2 \cdot 1000}, \quad (2.1)$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

F – расчетный фактор.

m – навеска геля, взятая для анализа, г.

Для расчета содержания фитиновой кислоты использовали коэффициент пересчета (1 г фитиновой кислоты содержит 0,282 г фосфора)

$$X = P / 0,282 \quad (2.2)$$

где P – содержание фосфора в препарате в граммах.

Для определения расчётного фактора F готовили стандартный раствор калия однозамещённого, для чего 0,19175 г (с точностью 0,00005 г) порошка, высушенного до постоянной массы, растворяли в воде в мерной колбе на 100 мл, доводили водой до метки и перемешивали. Из него готовили градуировочные растворы с содержанием фосфора 0,218 мг, 0,436 мг, 0,654 мг и 0,872 мг в 10 мл раствора, которые переносили в мерные колбы вместимостью 100 мл, в каждую колбу прибавляли по 50 мл раствора реагентов и доводили объем до метки водой очищенной. Растворы перемешивали и помещали на 30 мин в темное место, после чего фиксировали значение оптической плотности полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 425 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, приготовленный смешиванием 1 мл кислоты азотной разведенной и 20 мл раствора реагентов в мерной колбе на 100 мл, и доведенный до метки водой очищенной. Расчетный фактор представляет собой общее количество миллиграммов фосфора в 100 мл градуировочного раствора при поглощающей способности его равной 1,00 по формуле 2.3.:

$$F = \Sigma C_i / \Sigma A_i \quad (2.3)$$

где C_i – содержание фосфора в 100 мл каждого градуировочного раствора в миллиграммах.

A_i – оптическая плотность каждого градуировочного раствора.

Например:

C_i мг/100 мл	A_i при 425 нм
0,218	0,097
0,436	0,208
0,654	0,318
0,872	0,425
$\Sigma C_i = 2,18$	$\Sigma D_i = 1,048$

$$F = 2,18 / 1,048 = 2,08$$

Расчетный фактор должен лежать в интервале от 2,02 до 2,15. Его определение повторяют при изменении условий анализа.

2.2.2. Методика анализа фитиновой кислоты с реактивом Вэйда в присутствии аминов

Реактив Вэйда готовили непосредственно перед анализом, смешивая раствор А (0,3240 г сульфосалициловой кислоты в 100 мл воды) с раствором Б (0,0324 г $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ в 100 мл воды) в соотношении 1:1 по объёму (1 мл реагента содержал 0,2 μ моль железа). Для построения калибровочной кривой и анализа использовали молярное соотношение «фитиновая кислота-реагент» – 1:3. В качестве холостого опыта использовали пробу в которой фитиновая кислота отсутствует.

Для калибровочного графика использовали по 5 мл растворов фитиновой кислоты концентраций (μ моль/л) 150, 300, 450, 600, 750 и 1000, которые переносили в колбу ёмкостью 50 мл, и после добавления 30 мл реагента доводили до метки водой очищенной.

Для изучения зависимости комплексообразования от количества и

природы амина использовали 300 μM раствор фитиновой кислоты и растворы аминов (ксимедон, трисамин, глюкозамина гидрохлорид) с концентрациями 300, 600, 900, 1800, 3000, 3600 и 4200 $\mu\text{моль/л}$, которые смешивали с таким расчётом, чтоб при сливании равных объёмов с фитиновой кислотой получались молярные соотношения 1:1, 1:2, 1:3, 1:6, 1:10, 1:12, 1:14. В качестве контроля использовали пробу, содержащую раствор фитиновой кислоты, и реагента. Предварительно оценивали спектры поглощения растворов аминов тех же концентрациях ($\mu\text{моль/л}$) 300, 600, 900, 1800, 3000, 3600 и 4200, что и в смесях с фитиновой кислотой.

2.2.3. Идентификация и количественное определение ксимедона УФ-спектральным и ВЭЖХ методами в воде и растворах фитиновой кислоты

Для построения калибровочного графика протонированной формы ксимедона ($\lambda_{\text{max}} = 309 \text{ нм}$) спектрофотометрическим методом использовали *стандартные растворы*: 0,002 г\л (0,003; 0,004; 0,005 г\л) – точная навеска – ксимедона помещали в мерную колбу и доводили до метки 0,1М раствором соляной кислоты (раствор А). 1 мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили водой до метки. Для получения *растворов комплексов фитиновой кислоты с ксимедоном* в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 0,30 г 50%-ого раствора фитиновой кислоты и 0,23 г ксимедона (точные навески) доводили водой до метки. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу на 100 мл и доводили водой до метки.

ВЭЖХ-анализ ксимедона в растворе и геле. Для калибровки использовали *стандартный раствор 1*: 50 мг (точная навеска) стандартной субстанции ксимедона помещали в стакан на 50 мл, добавляли 9,95 г ацетонитрила и перемешивали до полного растворения ксимедона. 1 г полученного раствора помещали в колбу на 500 мл и доводили до метки водой дистиллированной (соответствует 50% ожидаемой концентрации

испытуемого раствора). *Стандартный раствор 2*: 100 мг (точная навеска) стандартной субстанции ксимедона помещали в стакан на 50 мл, добавляли 9,90 г ацетонитрила и перемешивали до полного растворения ксимедона. 1 г полученного раствора помещали в колбу на 500 мл, доводили до метки водой дистиллированной и перемешивали (соответствует 100% ожидаемой концентрации испытуемого раствора). *Стандартный раствор 3*: 150 мг (точная навеска) стандартной субстанции ксимедона помещали в стакан на 50 мл, добавляли 9,85 г ацетонитрила и перемешивали до полного растворения ксимедона. 1 г полученного раствора помещали в колбу на 500 мл и доводили до метки водой дистиллированной (соответствует 150% ожидаемой концентрации испытуемого раствора). *Испытуемый раствор комплексов фитиновой кислоты с ксимедоном*: В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 2,50 г ксимедона и 3,25 г 50%-ого раствора фитиновой кислоты (точные навески) доводили водой до метки. 1 мл водного раствора комплекса фитиновой кислоты с ксимедоном помещали в стакан на 50 мл, добавляли ацетонитрила до 10,00 г и перемешивали. 1 г полученного раствора помещали в колбу на 500 мл и доводили до метки водой дистиллированной.

2.2.4. Аналитические методики определения натрия гиалуроната в растворе

Методика: 0,03 г натрия гиалуроната помещали в мерную колбу на 100 мл и растворяли водой очищенной. К 2 мл полученного раствора, помещенного в пробирку с притертой пробкой, прибавляли 5 мл раствора натрия тетрабората в серной кислоте концентрированной, пробирку встряхивали и охлаждали в холодной воде. Затем, пробирку плотно закрывали притёртой пробкой и 15 минут нагревали на водяной бане. После охлаждения, прибавляли 0,20 мл раствора карбазола. Пробирку снова плотно закрывали и 15 минут нагревали на водяной бане с последующим охлаждением. Содержимое пробирки должно приобретало фиолетовое

окрашивание. Электромагнитный спектр поглощения раствора ($\lambda = 450-600$ нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм имеет максимум при $\lambda = 530 \pm 2$ нм. В качестве раствора сравнения использовали холостой опыт, в котором вместо 2 мл исследуемого раствора использовали воду очищенную.

2.2.5. Методика проведения потенциометрического титрования фитиновой кислоты аминами

Потенциометрическое титрование 0,076 М раствора фитиновой кислоты (исходный объём 20 мл, $n=1,19$ ммоль) проводили 1,19 М раствором ксимедона; 0,460 М раствором глюкозамина гидрохлорида; 0,830 М раствором трисамина. Титровали медленно при перемешивании магнитной мешалкой, останавливая процесс на 3 минуты после добавления каждой порции титранта до установления равновесия. В случае использования в качестве титранта глюкозамина гидрохлорида, проводили контрольный опыт для учёта влияния высвобождающейся соляной кислоты. В контрольном опыте проводили титрование 0,076 М раствора фитиновой кислоты (20 мл, $n=1,19$ ммоль) 0,460 М раствором HCl.

2.3. Методика выделения комплексов фитиновой кислоты с аминами в твёрдом состоянии

Комплексы фитиновой кислоты с ксимедоном (9:1). В химический стакан на 50 мл помещали 2,2850 г ксимедона и растворяли в минимально возможном количестве воды очищенной (≈ 4 мл). В полученный раствор вносили 2 мл 50% раствора фитиновой кислоты. Из полученной смеси на ледяной бане получали осадок, последовательным осаждением изопропанолом. Полученную суспензию фильтровали через фильтр Шотта. Аморфный осадок с фильтра помещали в эксикатор для удаления остатков

влаги. Характеристики осадка: УФ(нм) – 308±2; ИК(см⁻¹) – 1643, 1616, 1130, 1130-1030, 889; ПМР(м.д.) – 2,55(с); 2,71(с); 3,91; 3,92; 3,93(т); 4,30; 4,31; 4,32(т); 6,82(с); ¹³С-ЯМР(м.д.) – 19,5; 23,6; 49,4; 57,8; 108,2; 171,9; 168,4; 148,9; ³¹Р-ЯМР(м.д.) – размытые сигналы: 0,9; 0,65; 0,1; -0,2; -0,3; -0,8. Количественное содержание фосфора молибдатно-ванадатным методом – (%) – 11,30; теор.рассч. – 11,18.

Комплексы фитиновой кислоты с глюкозамином (5:1). В химический стакан на 50 мл помещали 1,6280 г глюкозамина гидрохлорида и растворяли в минимально возможном количестве воды очищенной (≈10 мл). В полученный раствор вносили 2 мл 50% раствора фитиновой кислоты. Из полученной смеси на ледяной бане получали осадок, последовательным осаждением этиловым спиртом. Полученную суспензию фильтровали через фильтр Шотта. Аморфный осадок с фильтра помещали в эксикатор для удаления остатков влаги. Характеристики осадка: ИК(см⁻¹) – 3354, 3292, 1618, 1585, 1539, 1138, 1094, 1059, 1034, 891; ПМР(м.д.) – 2,85, 2,87, 2,90 (т); 3,15, 3,16(д); 3,17, 3,18(д); 3,32, 3,33, 3,34, 3,35, 3,86, 3,38(м); 3,53; 3,55; 3,58; 3,59; 3,61; 3,63; 3,64; 3,66; 3,67; 3,70; 3,71; 3,74; 3,76; 3,78; 3,79; 4,80, 4,82(д); 5,31, 5,32(д); ¹³С-ЯМР(м.д.) – 92,6; 89,1; 76,1; 71,9; 71,5; 60,4; 60,2; 56,6; 54,2; ³¹Р-ЯМР(м.д.) – размытые сигналы: 0,8; 0,6; 0,3; -0,3; -0,4; -0,7. Количественное содержание азота, углерода и водорода элементным анализом(%) – 4,13; 28,62; 5,98; теор.рассч. – 4,40; 28,70; 6,04; фосфора молибдатно-ванадатным методом(%) – 11,92; теор.рассч. – 12,00.

Комплексы фитиновой кислоты с трисамином (10:1). В химический стакан на 50 мл помещали 1,8290 г трисамина и растворяли в минимально возможном количестве воды очищенной (≈5 мл). В полученный раствор вносили 2 мл 50% раствора фитиновой кислоты. Из полученной смеси на ледяной бане получали осадок, последовательным осаждением этиловым спиртом. Полученную суспензию фильтровали через фильтр Шотта. Аморфный осадок с фильтра помещали в эксикатор для удаления остатков влаги. Характеристики осадка: ИК(см⁻¹) – 3292, 1618, 1553, 1140, 1067(ш),

898; ^{13}C -ЯМР(м.д.) – 61,46; 61,25; 61,06; 59,35; 59,17; 58,95; 58,95; ^{31}P -ЯМР(м.д.) – размытые сигналы: 1,1; 0,55; -0,1; -0,3; -0,6; -0,7. Количественное содержание фосфора молибдатно-ванадатным методом – (%) – 10,035; теор.рассч. – 9,98.

2.4. Методика приготовления гидрофильного геля комплекса фитиновой кислоты с ксимедоном

В колбу помещали 12 г порошка гиалуроната натрия, при интенсивном перемешивании добавляли воду очищенную в количестве 1000 мл и оставляли набухать. Затем в полученный вязкий раствор при интенсивном перемешивании вводили 1 г консерванта нипагина, растворенного в 10 мл этанола. 75 г полученной массы помещали в колбу, туда же при интенсивном перемешивании помещали 12 мл 50% раствора фитиновой кислоты и 10 г ксимедона и доводили полученный гель водой до 100 г. Фиксировали рН и доводили до физиологического значения трисамином (не более 1%).

2.5. Медико-биологические исследования комплексов фитиновой кислоты с биологически активными аминами

Осмотическую активность ксимедона из изучаемого геля (кинетику выведения ксимедона из гидрогеля) проводили методом диализа через полупроницаемую мембрану (И.М.Перцев, 1979).

Методика: Стекланный цилиндр, дном которого служила целлофановая мембрана, помещали в сосуд со 100 мл дистиллированной воды ($36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) таким образом, чтобы мембрана из целлофана была погружена в воду на 2 – 5 мм (рис.2.1).

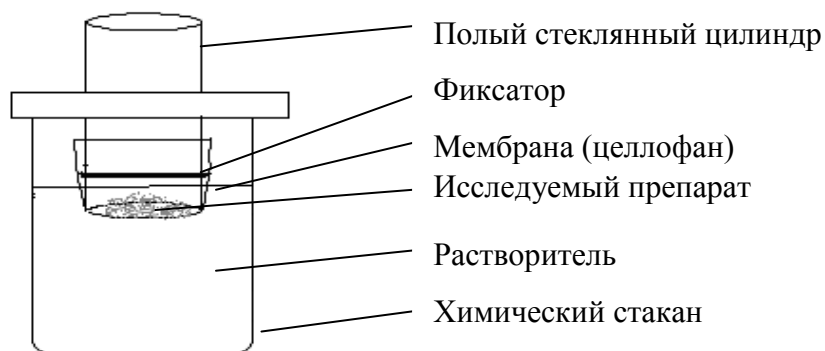


Рис.2.1. Установка для проведения диализа.

Кинетику выведения ксимедона из гидрогеля определяли методом оценки временной зависимости выделения физиологически активных веществ (ксимедона) из геля при температуре $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и исходных концентрациях геля $C_0=0,10$ мг/мл и $C_0=0,05$ мг/мл. Концентрацию ксимедона в диализате контролировали методом УФ-спектроскопии по интенсивности поглощения полосы с $\lambda_{\text{max}}=290$ нм, используя калибровочный график. В качестве мембраны применяли целлофановую мембрану толщиной 45 ± 1 мкм (ТУ 6-06-576-77).

2.5.1. Исследования влияния фитиновой кислоты и её производных на процессы липопероксидации *in vitro*

Хемилюминесцентный анализ (индуцированной железом и пероксидом водорода) на общую антиоксидантную активность проводили на биохемилюминометре марки БХЛ-06 (Н.Новгород). Методика. В кювету вносили 0,1 мл пробы, разводили её 0,4 мл фосфатного буфера, приливали 0,4 мл 0,5 mM раствора сульфата железа и 0,2% раствора перекиси водорода. Кювету помещали в кюветодержатель БХЛ-06 и измеряли интенсивность свечения за 30 сек. Фиксировали величины: I_{max} (mV), характеризующий максимальную вспышку хемилюминесценции; S (mV) – суммарная хемилюминесценция за 30 сек.; $\text{tg } \alpha_2$, показывающий скорость нормализации процессов свободно-радикального окисления; I_{max}/S – фактор

антиоксидантной активности.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали методом Т.В. Сироты [34]. Методика. В кювету помещали 2 мл бикарбонатного буфера (рН 10,65) и 0,1 мл 0,1% раствора адреналина. После добавления 0,01 мл исследуемого раствора, содержимое кюветы быстро перемешивали и измеряли величину оптической плотности при 347 нм в течении 3 мин. В контрольную пробу раствор не добавляли. Общую активность фермента (Е) вычисляли по формуле:

$$E(\% \text{ингибирования}) = [1 - (\Delta D_{\text{опыт}} / \Delta D_{\text{контроль}})] \cdot 100\%,$$

где $\Delta D_{\text{опыт}}$ и $\Delta D_{\text{контроль}}$ – скорости реакции аутоокисления адреналина, соответственно, в присутствии и отсутствии гомогената. Активность СОД выражали в условных единицах. За 1 условную единицу принимают 1% ингибирования.

Уровень малонового диальдегида (МДА) в плазме крови определяли с помощью тест-набора (ЗАО «АГАТ», Москва). Методика. К 0.1 мл плазмы крови добавляли 0.5 мл 10% трихлоруксусной кислоты (ТСА). Осадок белков удаляли центрифугированием и супернатант использовали для определения МДА. К 0.2 мл супернатанта добавляли 1.8 мл физиологического раствора, содержащего 10 % ТСА, 1.5 мл 0.9% раствора ТСА в 50% уксусной кислоте и раствор хлорного железа (FeCl_3) для распада до МДА предобразованных гидроперекисей липидов, нагревали при 100°C и после охлаждения определяли концентрацию МДА по поглощению раствора при 532 нм на спектрофотометре DU-50 (Beckman, США) в 1-см кювете.

Уровень первичных продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов (ДК) и триеновых конъюгатов (ТК) проводили в метанол-гексановой фазе экстракта липидов при длинах волн 232нм и 275нм, а также **по содержанию конечных продуктов – оснований Шиффа (ОШ)** методом флуоресценции при длине волны возбуждения 365нм и длине волны эмиссии 420нм [7].

2.5.2. Исследование эффективности действия гидрофильных гелей с комплексом фитиновой кислоты и ксимедона на процессы заживления ожоговых ран у крыс и антиоксидантной активности

Исследование эффективности действия гидрофильных гелей с комплексом фитиновой кислоты и ксимедона на процессы заживления ожоговых ран у крыс проводилось в лаборатории отделения экспериментальной медицины ФГБУ «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Животные. В экспериментах были использованы половозрелые (5 месяцев) белые крысы линии Wistar.

Источник животных. Питомник «Столбовая» ГУ НЦ БМТ РАМН.

Карантин/адаптация. Прибывшие животные до начала исследования были помещены в отдельную комнату на период адаптации (14 дней). Во время этого периода у животных контролировали проявление отклонений в состоянии здоровья согласно Стандартной операционной процедуре лаборатории «Прием животных, карантин, адаптация».

Распределение по группам. Животных распределяли по группам случайным образом, используя в качестве критерия массу тела, так, чтобы индивидуальная масса животных не отличалась более чем на 20% от средней массы животных одного пола.

Идентификация. Каждому животному был присвоен индивидуальный номер, в соответствии с которым животному ставилась метка либо проколом ушной раковины, либо окраской красителями (эозин и метиленовый синий) поверхности хвоста по разработанным схемам. На этикетке клетки определенного цвета указывали группу, номер животного, метку, код исследования, руководителя.

Содержание и уход. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, данным в руководстве *Guide for care and use of laboratory animals. ILAR publication, 1996, National Academy Press.* Все

процедуры по рутинному уходу за животными выполняли в соответствии с СОП лаборатории.

Время проведения экспериментов. Эксперименты проводились в весеннее время года (17-27 марта 2014 года).

Процедура введения вещества. Для оценки эффективности изучено наружное действие исследуемых препаратов при накожной аппликации в области ожоговой раны в первой половине дня в течение 10 суток лечения.

Доза применения препаратов (лекарственной формы) соответствовала 10 мг/см².

Моделирование инфицированной ожоговой раны. Моделирование ожога кожи III степени осуществляли путем нанесения на депилированную кожу поясничного отдела крыс дозированных ожогов площадью 235 мм² (3*78,5 мм²) с температурой ожоговой поверхности около 300°C и с длительностью соприкосновения с кожей 1 сек. Перед проведением данной процедуры крыс наркотизировали нембуталовым наркозом в дозе 35-40 мг/кг.

Лечение изучаемыми препаратами начинали на следующие сутки после термического воздействия и нанесения микроорганизмов и продолжали в течение 10 суток.

В эксперименте были использованы 15 беспородных крыс (самцы, масса тела 220-250 г), которые были разделены на 5 группы по 3 животных в каждой:

1. Контроль I интактные животные
2. Контроль II ожоговая рана + лечение гелем Декспантенол 4% для наружного применения
3. Ожоговая рана + лечение гелем с ксимедоном (гель «Левоксим»)
4. Ожоговая рана + лечение гелем с фитиновой кислотой
5. Ожоговая рана + лечение гелем с комплексом фитиновой кислоты и ксимедона (гель «Ксифит»)

Во время эксперимента регистрировали общее состояние животных, отмечали состояние и скорость заживления раневой поверхности.

Методы статистической обработки данных. Полученные результаты были обработаны на IBMPC/AT с помощью пакетов прикладных программ Statistica 6,0. Нормальность распределения значений параметров оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учётом характера распределения признака для оценки статистической значимости различий применяли Н-критерий Краскала-Уоллеса.

ГЛАВА 3.

3.1. Исследование взаимодействия фитиновой кислоты и ксимедона в водной среде и изучение свойств комплексов фитиновой кислоты с ксимедоном в твёрдом состоянии

Исследование реакции переноса протона в водной среде методом потенциометрического титрования

Исследование кислотно-основного взаимодействия ксимедона (Кси) и фитиновой кислоты в растворах методом потенциометрического титрования показало, что зависимость $\text{pH} = f(V_{\text{кси}})$ отражает характер титрования слабого (или очень слабого) основания сильной (или средней силы) кислотой, о чём свидетельствует pH исходного 5% (0,076 М) раствора фитиновой кислоты, равный 2.1 (рис. 3.1). Зависимость $\text{pH} = f(V_{\text{кси}})$ имеет несколько неявно выраженных ступеней, напоминая вид кривых титрования полифосфорных кислот.

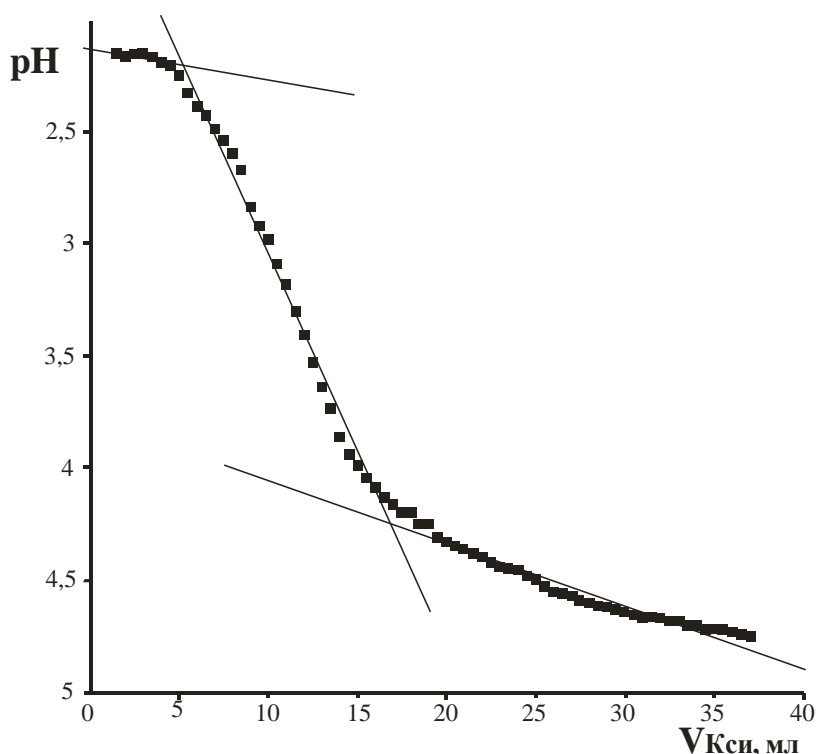
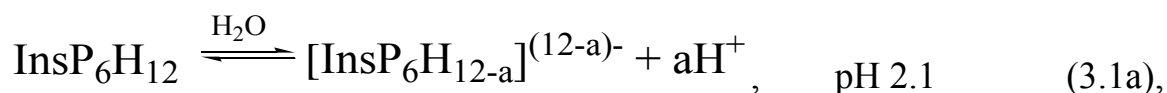


Рис. 3.1. Зависимость $\text{pH} = f(V_{\text{кси}})$ при титровании 0,076 М раствора $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ 1,19 М раствором Кси.

Рассматривая кривую титрования как плавную (без учёта незначительных скачков), в первом приближении можно оценить pK_a

кислоты KсиH^+ , сопряженной слабому основанию - ксимедону, как точку $\frac{1}{2}$ скачка pH; $\text{pKa} = 3.25$.

Сопряженная Кси кислота может образовываться как по реакции переноса протона от диссоциированной $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ в исходном водном растворе (3.1a), так и по таким механизмам, как нековалентное связывание другого гидроксила в фосфатной группе и взаимодействие за счёт водородных связей и электростатических сил.



где a – число протонов, образованных в результате диссоциации.



где X^- условно обозначен как фитат-анион.

УФ-спектральный анализ

Расчёт величины pKa для сопряженной ксимедону кислоты КсиH^+ , образующейся при взаимодействии с фитиновой кислотой в водной среде, был выполнен при сравнении данных растворения Кси и $\text{Кси}\cdot\text{HCl}$ в водной среде хлористоводородной и фитиновой кислот методом УФ-спектрального анализа. Из данных рисунка 3.2 а,б видно, что в кислых средах (в присутствии HCl) наблюдается батохромный сдвиг длины волны поглощения C=O группы ксимедона с 299,9 нм (вода) до 309 нм, а в щелочных средах (NaOH) максимум положения полосы остаётся неизменным, при этом интенсивность поглощения резко увеличивается с ростом pH.

Показателем интенсивности переноса протона при взаимодействии ксимедона с хлористоводородной кислотой может служить кажущийся молярный коэффициент экстинкции ϵ , поскольку оптическая плотность одной и той же концентрации ксимедона существенно различается в области pH от 4 до 13 и в интервале от 4 до 1 (рис. 3.2б).

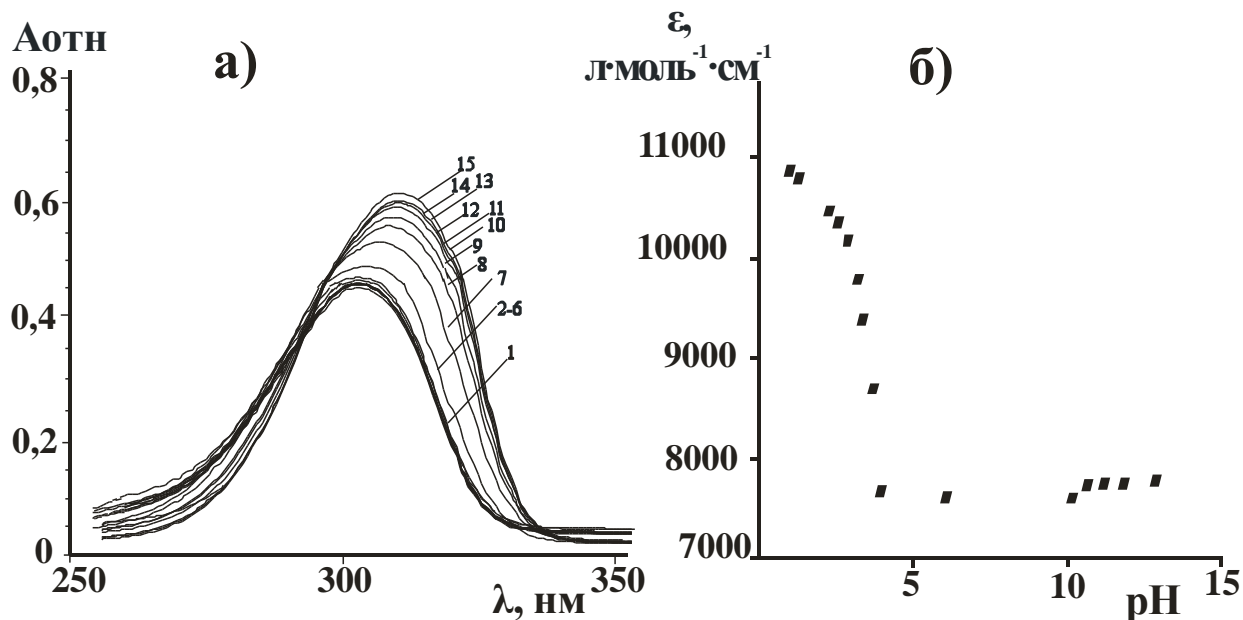


Рис. 3.2. Данные УФ-спектров поглощения $5,9 \cdot 10^{-5}$ М раствора Кси в водных растворах при различных рН: **а)** $A=f(\lambda)$; **б)** $\varepsilon=f(\text{pH})$.

Молярные коэффициенты экстинкции ε представлены в таблице 3.1 и рассчитаны в соответствии с уравнением Бугера-Ламберта-Бера и известных соотношениях [184]:

$$A = \varepsilon_{\text{кси}} \cdot C_{\text{кси}} \cdot l + \varepsilon_{\text{ксиH}^+} \cdot C_{\text{ксиH}^+} \cdot l \quad \text{при } l = 1 \text{ см} \quad (3.2)$$

$$\frac{C_{\text{кси}}}{C_{\text{ксиH}^+}} = \frac{\varepsilon - \varepsilon_{\text{ксиH}^+}}{\varepsilon_{\text{кси}} - \varepsilon} \quad (3.3),$$

где C – молярная концентрация, A – оптическая плотность, $\varepsilon = A/C \cdot l$

Кривая зависимости кажущегося молярного коэффициента экстинкции ε для ксимедона и его протонированной формы от рН раствора HCl имеет резкий скачок в интервале от 1 до 4, совпадающий с интервалом рН на кривой потенциометрического титрования фитиновой кислоты ксимедоном, но обладает более пологим переходом (рис.3.1, 3.2б). Данные рисунка 3.2б и таблицы 3.1 позволили нам рассчитать по уравнению (3.4) величину $\text{p}K_{\text{ксиH}^+}$ для Кси гидрохлорида, равную 3.25, что соответствует приближенной оценке $\text{p}K_{\text{ксиH}^+}$ по результатам потенциометрического титрования фитиновой кислоты ксимедоном.

$$pK_{\text{ксиH}^+} = \text{pH} - \lg \frac{\varepsilon - \varepsilon_{\text{ксиH}^+}}{\varepsilon_{\text{кси}} - \varepsilon} \quad (3.4)$$

Таблица 3.1.

УФ-спектральные данные $5,9 \cdot 10^{-5}$ МКси в водных растворах HCl и NaOH.

№ кривой	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	6,12	10,16	10,67	11,24	11,86	12,86	3,99	3,72
λ , нм	299,7	299,8	299,8	299,8	299,7	299,7	302,8	305,3
ε , л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	7627	7605	7733	7754	7759	7780	7667	8686
№ кривой	9	10	11	12	13	14	15	
pH раствора	3,40	3,22	2,92	2,62	2,31	1,33	1,00	
λ , нм	307,0	307,6	308,1	308,5	308,7	308,8	309,0	
ε , л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	9391	9777	10173	10357	10469	10788	10868	

Анализ УФ-спектров взаимодействия Кси и фитиновой кислоты показал, что в спектре, даже при значительном молярном избытке ксимедона – Кси:InsP₆H₁₂ = 14:1, наблюдается только основная полоса с $\lambda_{\text{max}} = 309$ нм, характерная для протонированной формы Кси (рис. 3.3, табл.3.2).

Таблица 3.2.

УФ-спектральные данные смеси $1 \cdot 10^{-5}$ М раствора фитиновой кислоты и ксимедона при различных молярных соотношениях.

№ кривой	C_{кси}, М·10⁵	n=C_{кси}:CInsP₆H₁₂	A_{отн.}	λ_{max}, нм	ε, л·моль⁻¹·см⁻¹
1	1,10	1:1	0,2758	309,6	25073
2	2,05	2:1	0,3935	309,2	19195
3	4,03	4:1	0,5941	309,1	14742
4	6,02	6:1	0,7075	309,0	11752
5	12,01	12:1	1,3414	309,1	11169
6	14,01	14:1	1,5096	309,1	10775
7	5,90	-	0,4500	299,9	7627

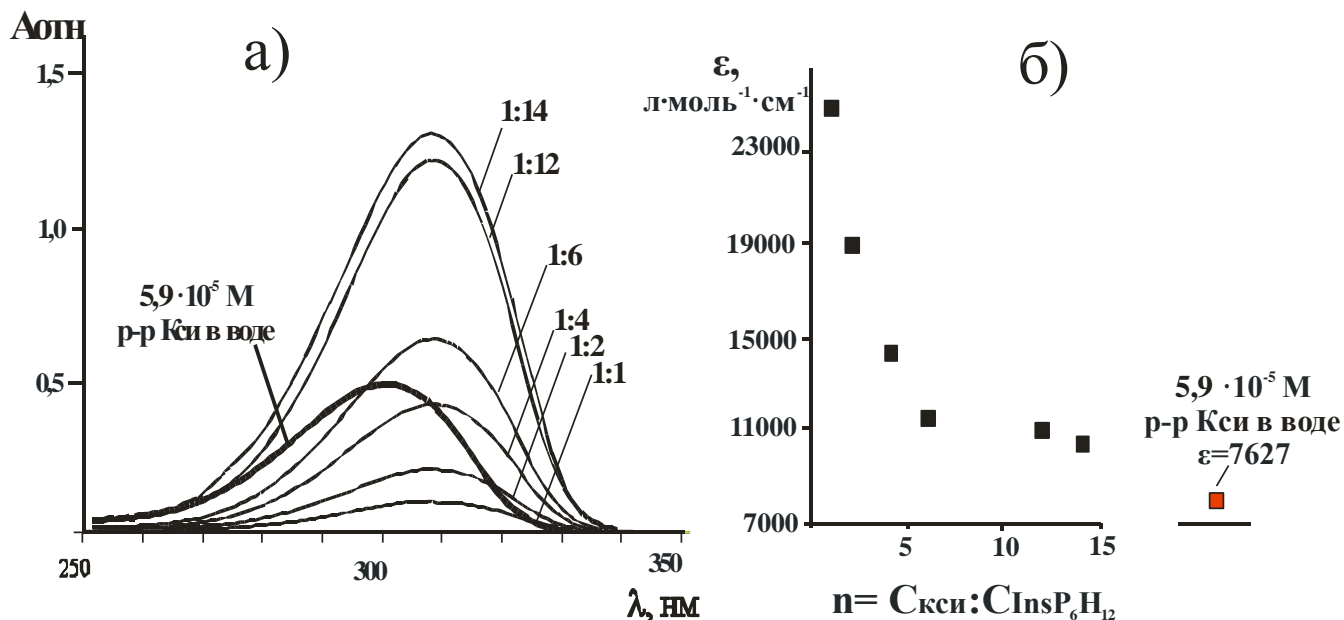


Рис. 3.3. УФ-спектры поглощения $1 \cdot 10^{-5}$ M растворов $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ и Кси при различных молярных соотношениях n (табл.2): **а)** $A=f(\lambda)$; **б)** $\epsilon=f(n)$.

Этот результат может быть объяснён возможностью образования различных структур протонированной формой ксимедона (схема 1).

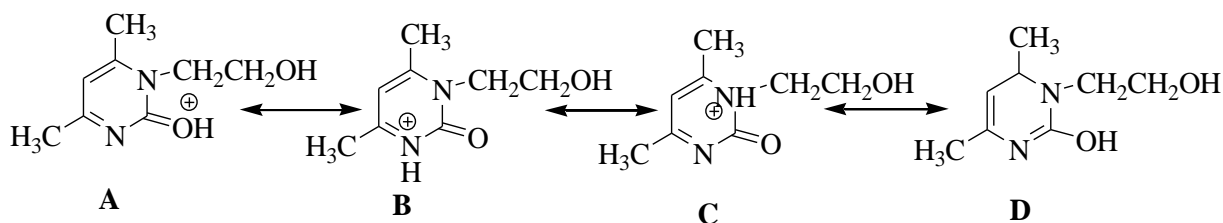


Схема 3.1. Возможные структуры протонированного Кси.

Анализ твёрдого продукта взаимодействия ксимедона и фитиновой кислоты

Характер протонирования ксимедона $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ оценивался также по твёрдому продукту – комплексу ФК с Кси, полученному осаждением пропанолом-2 из реакционной смеси. Данные ^1H -, ^{13}C -ЯМР и ИК-спектроскопии сопоставлены со спектрами Кси и Кси гидрохлорида $[\text{КсиH}^+]\text{Cl}^-$.

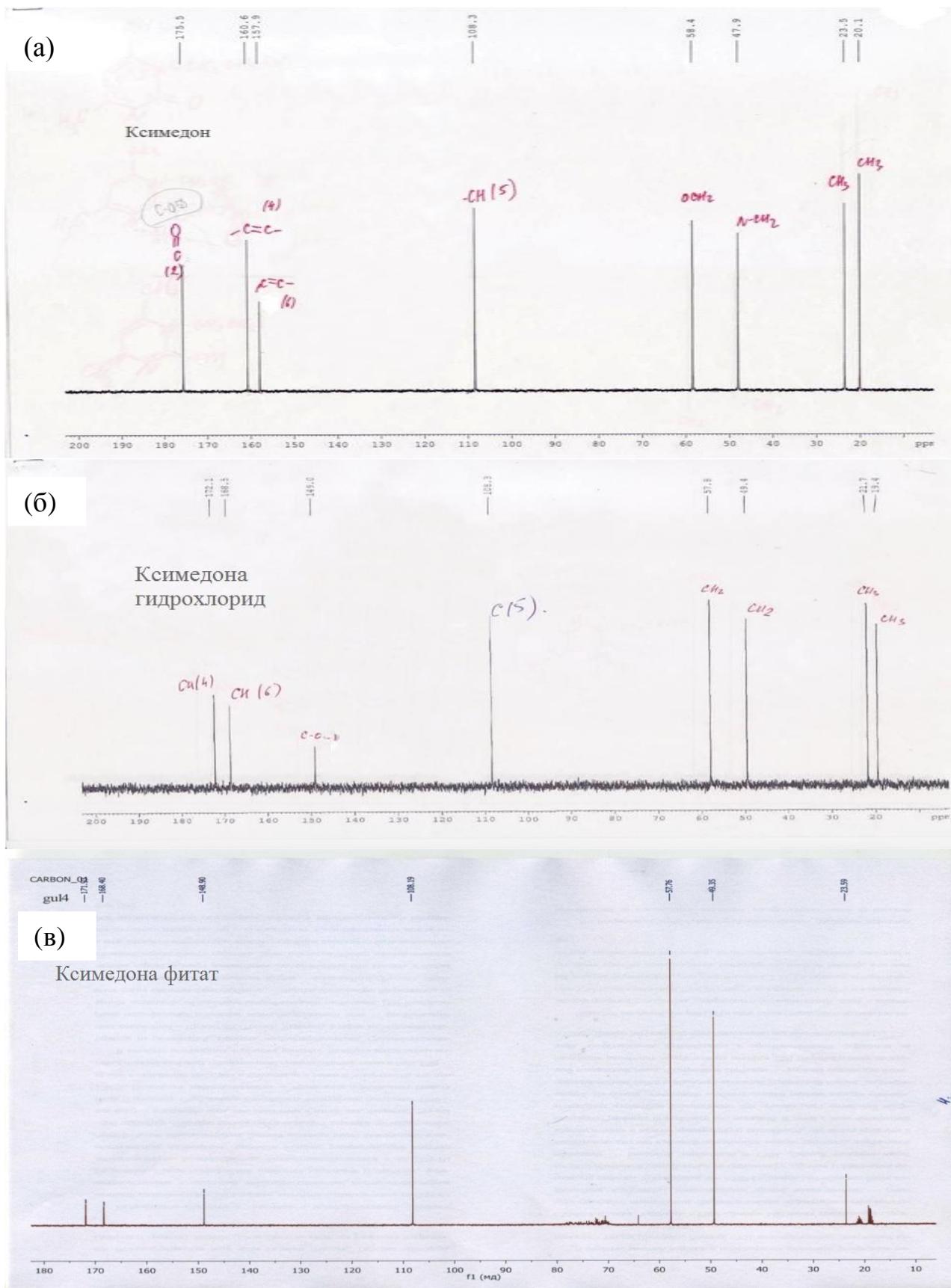


Рис. 3.4. ¹³C-ЯМР спектры ксимедона (а), ксимедона гидрохлорида (б) и комплекса фитиновой кислоты и ксимедона (условно – ксимедона фитат) (в).

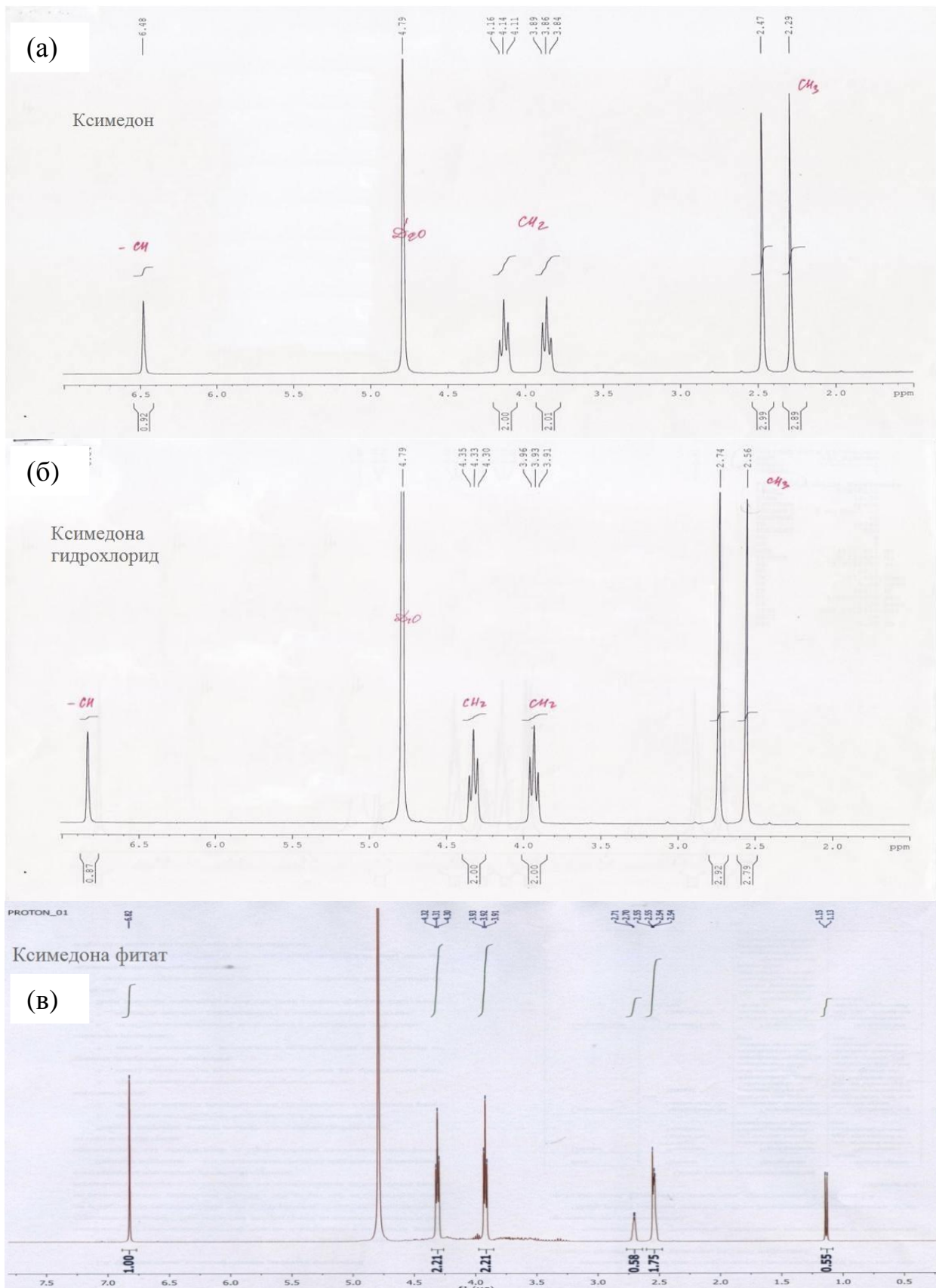
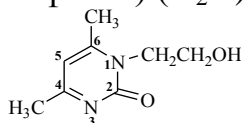


Рис. 3.5. ^1H -ЯМР спектры ксимедона , ксимедона гидрохлорида (б) и комплекса фитиновой кислоты и ксимедона (условно – ксимедона фитат) (в).

Таблица 3.3.

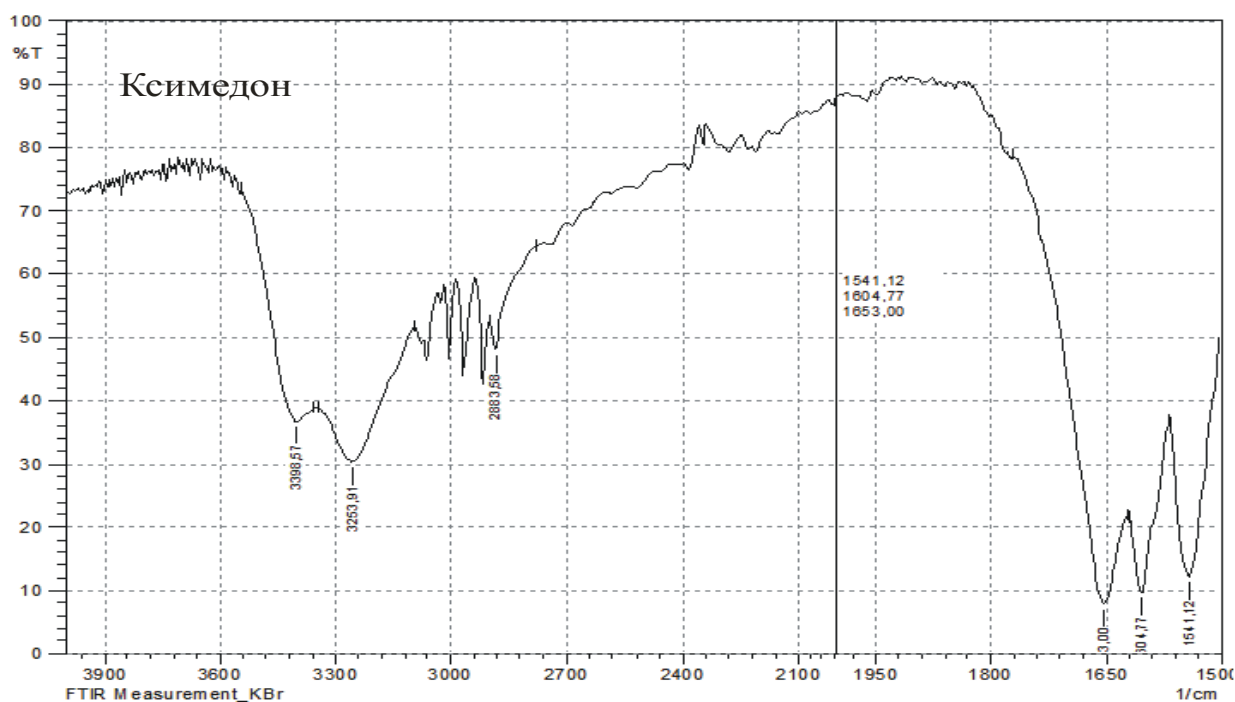
Данные ЯМР спектров Кси, [КсиН⁺]Сl⁻ и комплекса ФК и Кси (условно – КсиН⁺фитат) (D₂O)



Группа		¹³ С ЯМР δ, м.д.	¹ Н ЯМР δ, м.д.
-CH ₃ (6)	Кси	20,1	2,29
	КсиН⁺хлорид	19,4	2,56
	КсиН⁺фитат	19,5	2,55
-CH ₃ (5)	Кси	23,1	2,47
	КсиН⁺хлорид	21,7	2,74
	КсиН⁺фитат	23,6	2,71
N-CH ₂ (1)	Кси	47,9	3,89 3,86 3,84
	КсиН⁺хлорид	49,4	3,96 3,93 3,91
	КсиН⁺фитат	49,4	3,91 3,92 3,93
-CH ₂ -ОН	Кси	58,4	4,16 4,14 4,11
	КсиН⁺хлорид	57,8	4,35 4,33 4,30
	КсиН⁺фитат	57,8	4,30 4,31 4,32
СН	Кси	108,3	6,48
	КсиН⁺хлорид	108,3	6,84
	КсиН⁺фитат	108,2	6,82
С=C (4)	Кси	160,6	-
	КсиН⁺хлорид	172,1	-
	КсиН⁺фитат	171,9	-
С=C (6)	Кси	157,9	-
	КсиН⁺хлорид	168,5	-
	КсиН⁺фитат	168,4	-
С=О (2)	Кси	175,5	-
	КсиН⁺хлорид	149,0	-
	КсиН⁺фитат	148,9	-

В ^{13}C -ЯМР спектрах наблюдаются наиболее существенные изменения (рис.3.4, табл. 3.3). Разница в химических сдвигах у атомов углерода карбонильной группы соединений комплекса фитиновой кислоты с Кси и $[\text{КсиН}^+]\text{Cl}^-$ (рис. 3.4 б, в) по отношению к Кси (рис. 3.4 а) составляет 25 м.д. Сигналы ^1H и ^{13}C -ЯМР спектров Кси фитата и гидрохлорида (рис.3.4 б, в; рис. 3.5. б, в) практически совпадают, но отличаются от исходного Кси (рис 3.4 а; рис. 3.5 а), что свидетельствует о близкой структуре катионоидной части комплекса.

В ИК-спектрах твёрдого осадка, выделенного из реакционной смеси ксимедона и фитиновой кислоты, содержатся все валентные колебания протонированной формы ксимедона (рис.3.6). Кроме того, в спектрах выявлены полосы валентных колебаний С-О (эфирной) связи – 1130-1030 см^{-1} ; появляются полосы, характерные для аниона фитиновой кислоты, отражающие колебания Р-О связи 889 см^{-1} со сдвигом $\Delta\nu$ в продукте относительно исходной фитиновой кислоты [63], равным 2 см^{-1} . Колебания фосфорильной группы проявлялись в виде полосы 1130 см^{-1} , а также в области 1616 см^{-1} , в отличие от валентных колебаний фитиновой кислоты (1643 см^{-1}), $\Delta\nu = 27 \text{ см}^{-1}$ (рис.3.7).



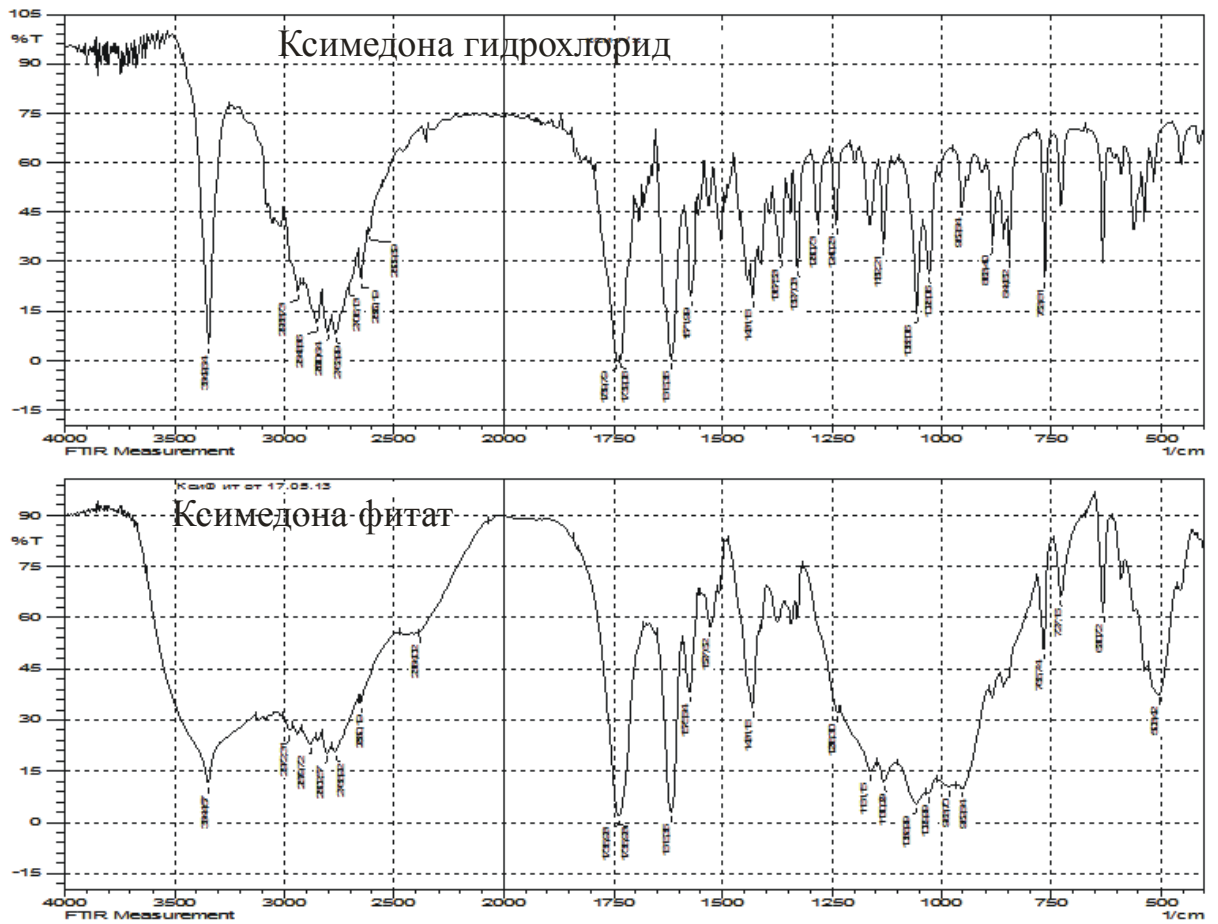


Рисунок 3.6. ИК-спектры ксимедона, ксимедона гидрохлорида и фитиновой кислоты с ксимедоном (условно – ксимедона фитат).

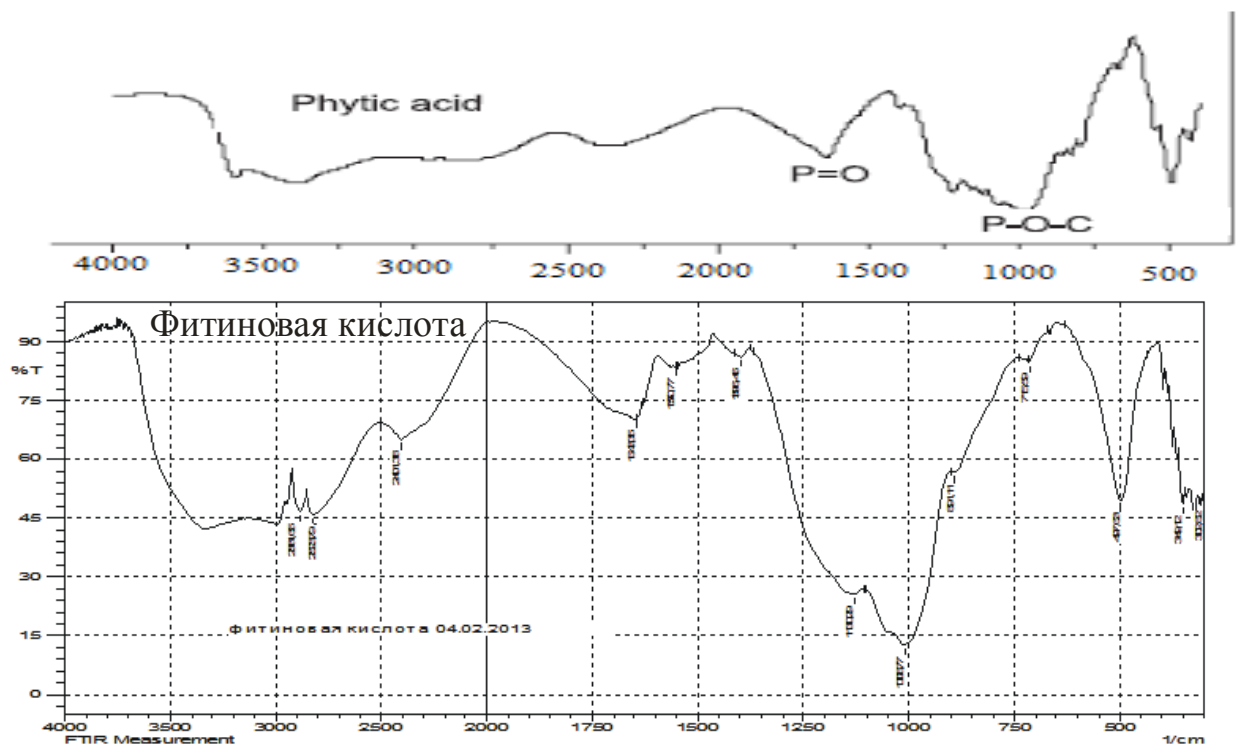


Рисунок 3.7. ИК-спектры фитиновой кислоты (литературные [63] и экспериментальные данные).

Доказательством сохранения структуры цикла InsP_6 , как носителя шести фосфатных групп в комплексе с Кси, является эксперимент с реактивом Вэйда, в котором сульфосалицилатный комплекс Fe (III) способен количественно взаимодействовать с фосфатными группами гексакисфосфатом мио-инозита (табл 3.4) [182].

Таблица 3.4.

Анализ фитиновой кислоты с реактивом Вэйда в смесях с ксимедоном.

$\text{InsP}_6\text{H}_{12}:\text{Кси}$	конц. Кси, μM	$A_{\text{текущее}}$	$A_0 - A_{\text{тек}}$
1:1	300	0,3307	0,2132
1:2	600	0,3320	0,2119
1:3	900	0,3284	0,2155
1:6	1800	0,3309	0,2130
1:10	3000	0,3279	0,2160
1:12	3600	0,3291	0,2148
1:14	4200	0,3314	0,2124
1:0 (контроль $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$)	0	0,3288	0,2151

A_0 – оптическая плотность реагента в отсутствие I, $A_0=0,5439$.

Полученные нами данные позволили предположить, что в водных растворах даже при избытке Кси, вероятно, его комплексообразование с фитиновой кислотой протекает довольно сложно с образованием ионных и Н-ассоциированных агрегатов, в которых катионная часть представлена протонированной формой ксимедона и имеющих аналогию с комплексами, образующимися по типу «гость-хозяин», в котором роль «хозяина» выполняет фитиновая кислота (рис. 3.8).

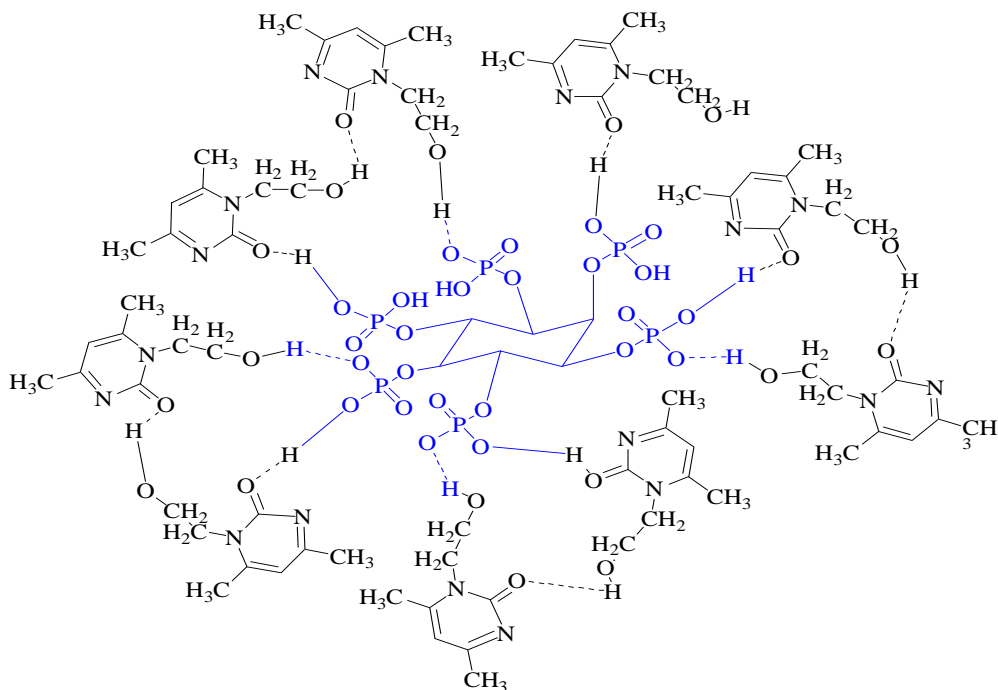


Рис. 3.8. Предполагаемая структура Н-ассоциированных агрегатов ксимедона и фитиновой кислоты.

Результаты, полученные с реактивом Вэйда, позволяют кроме прочего прогнозировать сохранение высоких антиоксидантных свойств фитиновой кислоты в составе комплексов с Кси.

Выводы по пункту 3.1.

Методами ИК- УФ- ^1H - и ^{13}C - ЯМР спектроскопии, и потенциометрическим титрованием показано, что взаимодействие миоинозитгексакисфосфата ($\text{InsP}_6\text{H}_{12}$) и 1-(β -оксиэтил)-4,6-диметил-1,2-дигидро-2-оксопиримидина (ксимедона) в водном растворе протекает через стадию переноса протона с образованием ионных и Н-ассоциированных комплексов, причём взаимодействие с Кси происходит по атому кислорода карбонильной группы.

Комплексообразование фитиновой кислоты с аминами через стадию реакций с переносом протона подтверждены потенциометрическим титрованием. УФ-спектральные и потенциометрические исследования

позволили рассчитать сопряженной ксимедону кислоты $pK_{\text{КСиН}^+}=3,25$ в реакции с $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ и HCl .

3.2. Комплексы фитиновой кислоты с глюкозамина гидрохлоридом и трисамином

Представляло интерес исследовать комплексы, полученные из фитиновой кислоты и глюкозамина гидрохлорида, и фитиновой кислоты и трисамина, а также изучить фармакологическую направленность действия этих комплексов с целью создания на их основе новых лекарственных средств в виде растворов, гидрофильных гелей, лосьонов.

Нековалентное взаимодействие фитиновой кислоты с биологически активными аминами в водных средах

Потенциометрическое исследование взаимодействия $[\text{ГАН}^+]\text{Cl}^-$ и $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ в водных растворах показало, при титровании 5% (0,076 М) раствора $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ ГА гидрохлоридом (0,460 М) равными порциями с остановками для установления равновесия, скорость изменения рН непостоянна. Вначале рН изменяется быстро при добавлении небольшого объема титранта, затем скорость изменения рН постепенно уменьшается. Изменение рН происходило ступенчато от рН 2,1 (pK_a для диссоциации по первой ступени $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ равно 1,90) до рН 1,7 (рис. 3.9, кривая 1). Основное влияние на форму кривой титрования оказывает диссоциация $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ (уравнение 3.5а) и присутствие в системе хлорид-иона, способствующего стабилизации депротонированной формы [40]. Последний нижний участок указывает на присутствие в системе раствора HCl и завершение образования комплекса фитиновой кислоты и ГА в этих условиях (уравнение 3.5б).

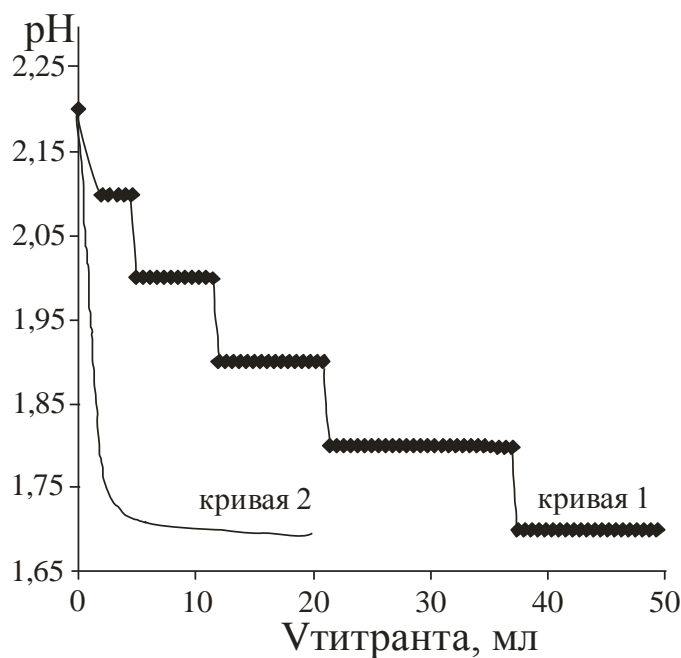
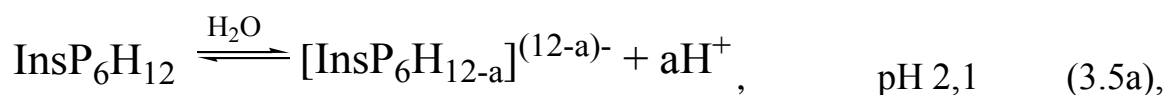


Рис. 3.9. Зависимость $\text{pH}=\text{f}(\text{V}_{\text{титранта}})$, титрование 0,076 М раствора $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ 0,460 М раствором $[\text{ГАН}^+]\text{Cl}^-$ (кривая 1) и 0,460 М HCl (кривая 2).

О появлении в системе HCl также свидетельствует контрольный опыт добавления в раствор $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ 3,5 мл 0,460 М раствора HCl и снижения pH раствора до той же самой величины – pH 1,7 (рис. 3.9, кривая 2).



где a – число протонов, образованных в результате диссоциации.



где X^- условно обозначен как фитат-анион.

Диссоциация $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ в воде происходит преимущественно по первой ступени (pK_a 1,90) во всех шести фосфатных группах, аналогично диссоциации фосфорной кислоты (pK_a 2,12) и глюкозо-1-фосфата (pK_a 1,10) при отрыве первого протона [4].

В целом, зависимость $\text{pH}=\text{f}(\text{V}_{\text{ГАН}^+})$ можно рассматривать как кривую титрования многоосновного основания – аниона фитата, кислотой – протонированным ГА (катионной кислотой или ониевым ионом). Можно предположить, что в случае комплекса фитиновой кислоты и ГА, наиболее

вероятно, образуются соединения солевого типа, стабилизированные хлорид-ионом, что согласуется с литературными данными [40].

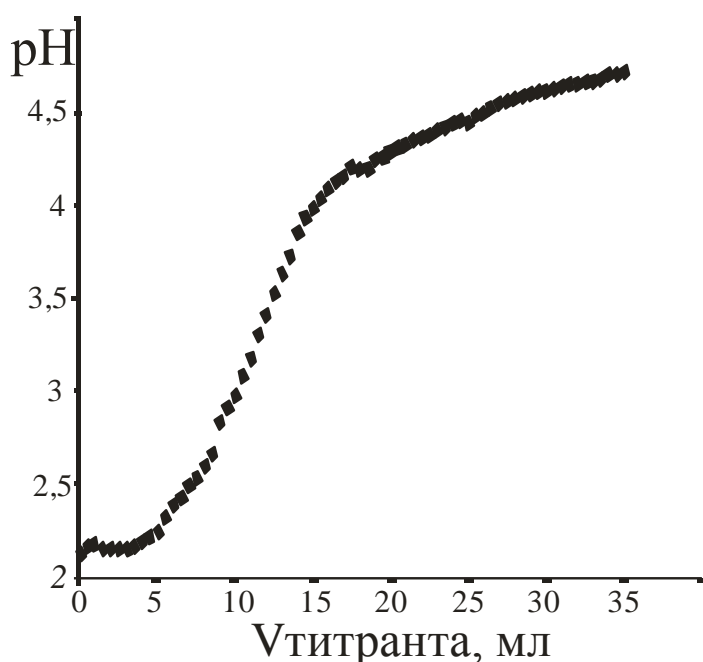


Рис. 3.10. Зависимость $\text{pH}=\text{f}(\text{vTA})$ при титровании 0,076 М раствора $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ 0,830 М раствором ТА.

В отличие от этого, вид кривой титрования $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ трисамином близок к кривой титрования кислоты ксимедоном, что свидетельствует об образовании сопряженной трисамину кислоты в следствие реакции переноса протона, что говорит о том, что в образование комплексов фитиновой кислоты и ТА большой вклад вносит донорно-акцепторное взаимодействие и водородное связывание(рис. 3.10).

Стехиометрия 5:1, полученная при потенциометрическом титровании глюкозамина гидрохлорида фитиновой кислотой подтверждается результатами элементного анализа твёрдого продукта, полученного высаливанием комплекса фитиновой кислоты с ГА этанолом из водного раствора (табл. 3.5).

Таким образом, на основании элементного анализа, состав фитиновой кислоты и ГА может быть представлен как $\text{InsP}_6 \cdot 5\text{ГА}$.

Таблица 3.5.

Элементный анализ комплекса фитиновой кислоты и глюкозамина

Система	С [%]		Н [%]		N [%]		Р [%]	
	Рассч.	Эксп. найд.	Рассч.	Эксп. найд.	Рассч.	Эксп. найд.	Рассч.	Эксп. найд.
Комплекс фитиновой кислоты и ГА (InsP ₆ ·5ГА)	28,70	28,62	6,04	5,98	4,40	4,13	1,19	1,22
Абс. откл.	0,540		0,069		0,080		0,090	
Отн.откл.RSD%	1,900		1,157		1,920		1,592	

ГА и, соответственно, его протонированные формы, выступающие в качестве лиганда в комплексах, существуют в виде α - и β -эпимеров, что находит отражение в ¹³С ЯМР спектрах (рис. 3.11). Основные сигналы (δ , ppm) [ГАН⁺][Сl⁻] (С1 α -эпимер 92,6 и β -эпимер 89,1; 76,1; 71,9; 71,5; 69,7; 60,5; 60,3; 55,7; 54,3) и комплекса фитиновой кислоты и ГА (С1 α -эпимер 92,6 и β -эпимер 89,1; 76,1; 71,9; 71,5; 60,4; 60,2; 56,6; 54,2) практически совпадали[48], (рис. 3.11).

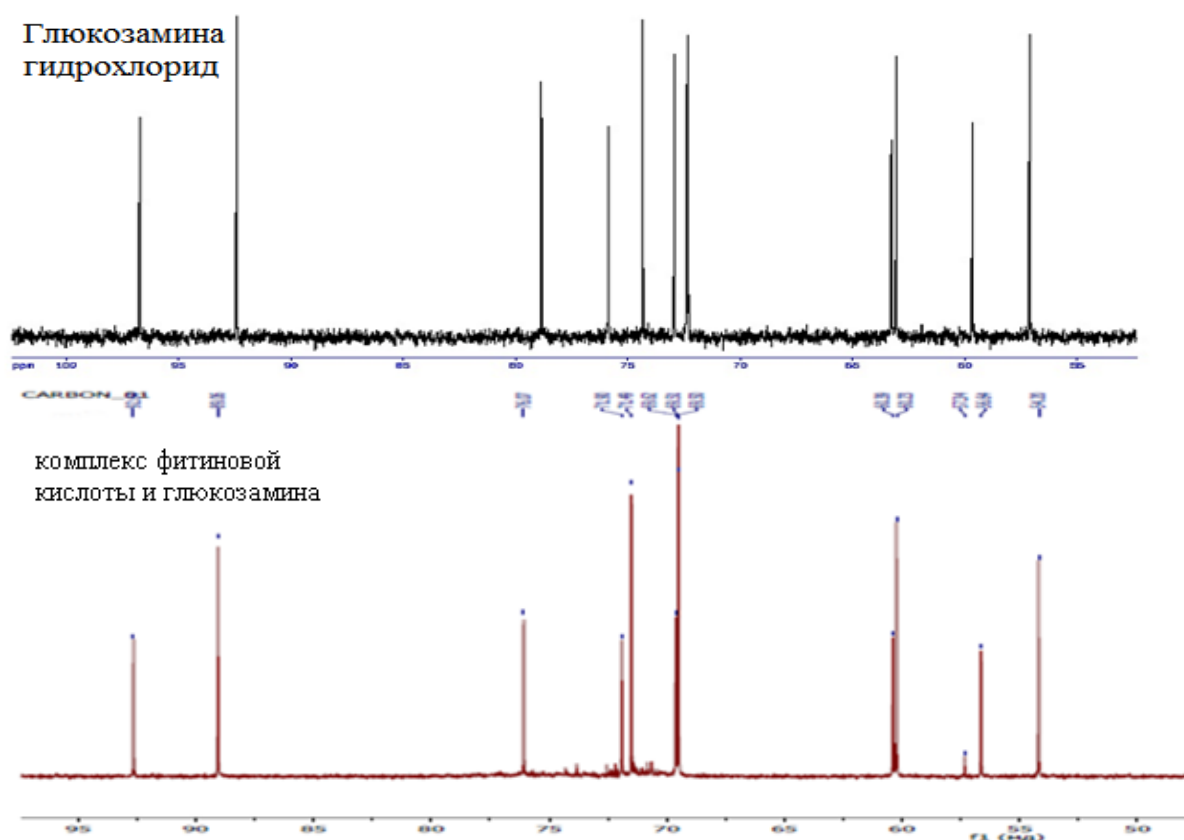


Рис. 3.11. ¹³С-ЯМР спектры глюкозамина гидрохлорида и комплекса фитиновой кислоты и глюкозамина.

ПМР спектр комплекса фитиновой кислоты и ГА (D_2O) содержит следующие сигналы (δ , ppm): два т. 2,85, 2,87, 2,90; два д. 3,15, 3,16, 3,17, 3,18; мультиплет 3,32, 3,33, 3,34, 3,35, 3,86, 3,38; комплекс для двух эпимеров 3,53, 3,55, 3,58, 3,59, 3,61, 3,63, 3,64, 3,66, 3,67, 3,70, 3,71, 3,74, 3,76, 3,78, 3,79; д. 4,80, 4,82; д. 5,31, 5,32, которые близки с сигналами смеси эпимеров исходного $[ГАН^+][Cl^-]$ [48, 140] (рис. 3.12).

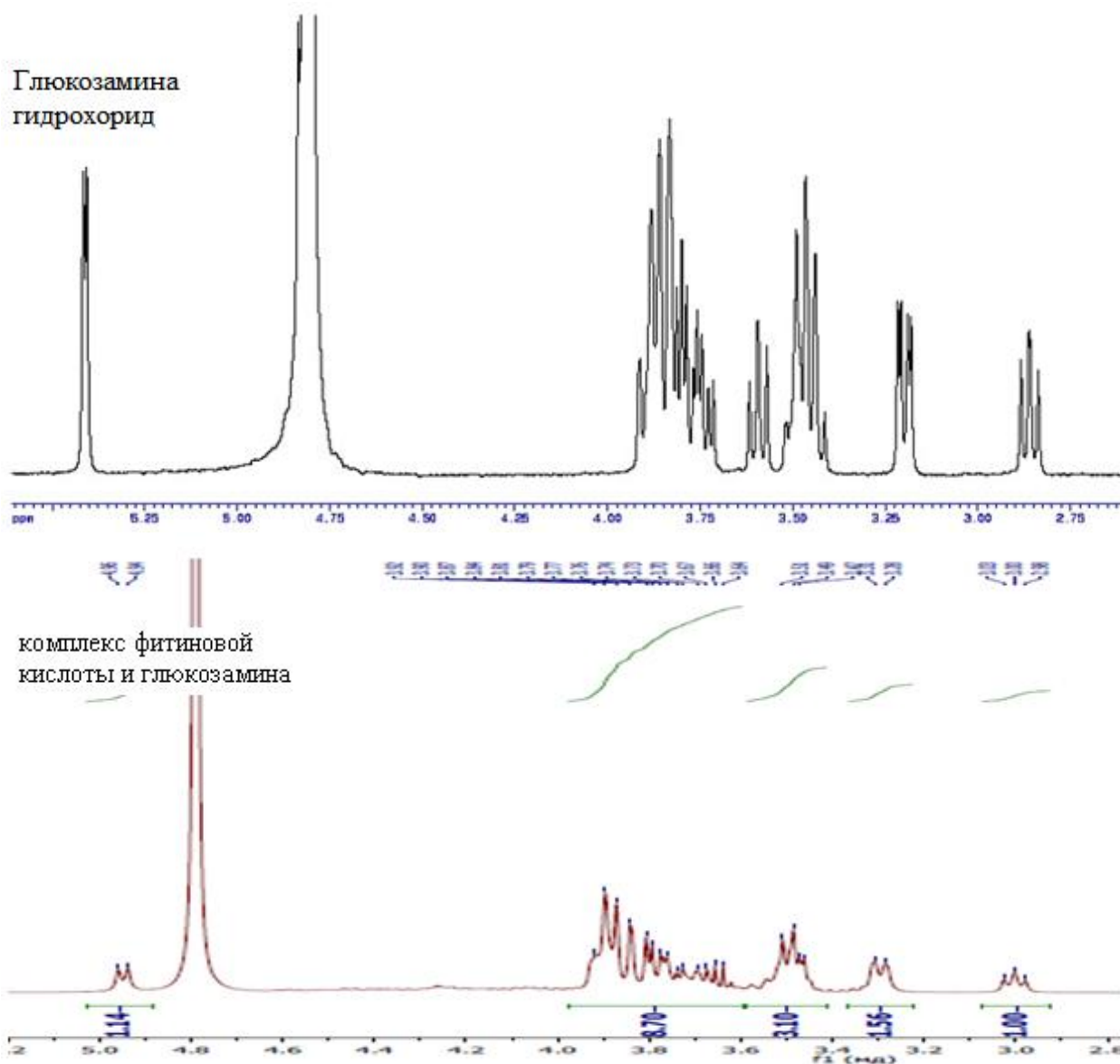


Рис. 3.12. 1H -ЯМР спектры глюкозамина гидрохлорида и комплекса фитиновой кислоты и глюкозамина.

Из данных ЯМР спектров следует, что катионоидный фрагмент комплекса имеет близкую структуру с протонированной частью глюкозамина гидрохлорида.

В реакции образования комплексов фитиновой кислоты и трисамина используется изначально не протонированный амин (как и в случае с ксимедоном), в связи с чем при сравнении ^{13}C и ПМР спектров трисамина и комплекса фитиновой кислоты и ТА мы наблюдаем образование протонированных форм ТА в катионидной части последнего (рис. 3.13).

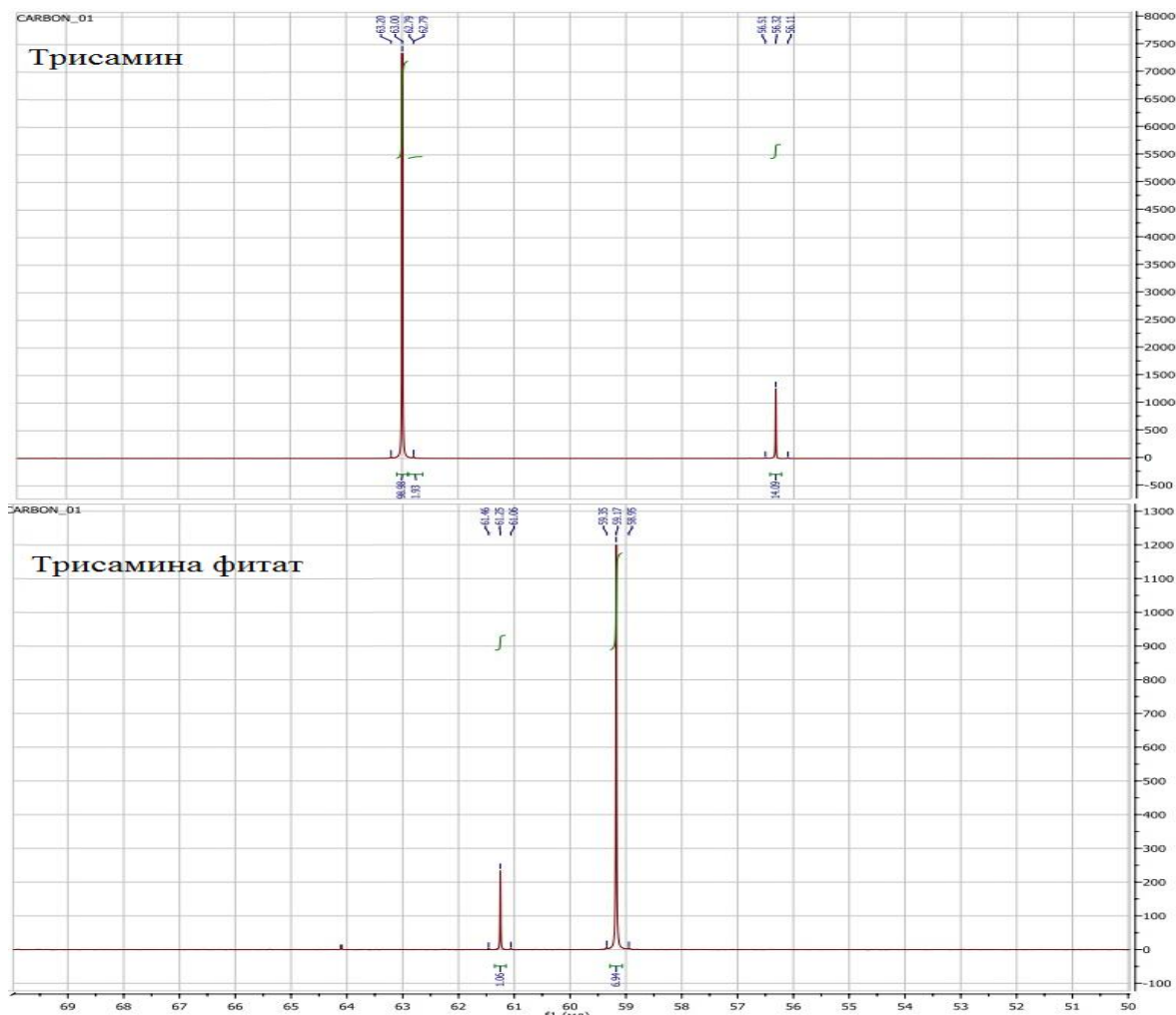


Рис. 3.13. ^{13}C -ЯМР спектры трисамина и комплекса фитиновой кислоты с трисамином (условно – трисамина фитат) (D_2O).

На ^{13}C -ЯМР спектрах комплекса фитиновой кислоты и трисамина наблюдалось смещение полосы C-NH_2 трисамина с 63 м.д. в сторону более протонированной формы 64 м.д. (рис. 3.13). Сопоставление ^{13}C -ЯМР спектров комплексов и исходных аминов показало, что наиболее существенные изменения наблюдаются у атомов углерода карбонильной группы: разница в химических сдвигах для комплекса фитиновой кислоты и

ТА составила почти 5 м.д., а для комплекса с Кси 25 м.д. Наличие подобных изменений в спектрах комплексов свидетельствует о том, что в образующихся соединениях в роли катиона выступают протонированные формы аминов.

Из основных сигналов ^{13}C ЯМР спектров (δ , ppm) ТА (63,20; 63,00; 62,79; 62,79; 56,51; 56,32; 56,11) и комплекса фитиновой кислоты с ТА (61,46; 61,25; 61,06; 59,35; 59,17; 58,95; 58,95) наблюдалось смещение полосы C-NH₂ ТА с 63 м.д. в сторону более протонированной формы 64 м.д. Сопоставление ^{13}C -ЯМР спектров комплекса и исходного ТА показало изменения у атомов углерода карбонильной группы: разница в химических сдвигах для комплекса фитиновой кислоты и ТА составила почти 5 м.д.

^{31}P ЯМР спектры комплексов фитиновой кислоты с ГА и ТА, близки и позволяют предположить структуры с неэквивалентными фосфатными группами. На рис. 3.14 а это наблюдение проиллюстрировано на примере комплекса фитиновой кислоты и ГА. Значения химических сдвигов лежат в интервале от -1 до +1, что является типичным для фосфатных эфиров биогенных соединений (рис. 3.14 б).

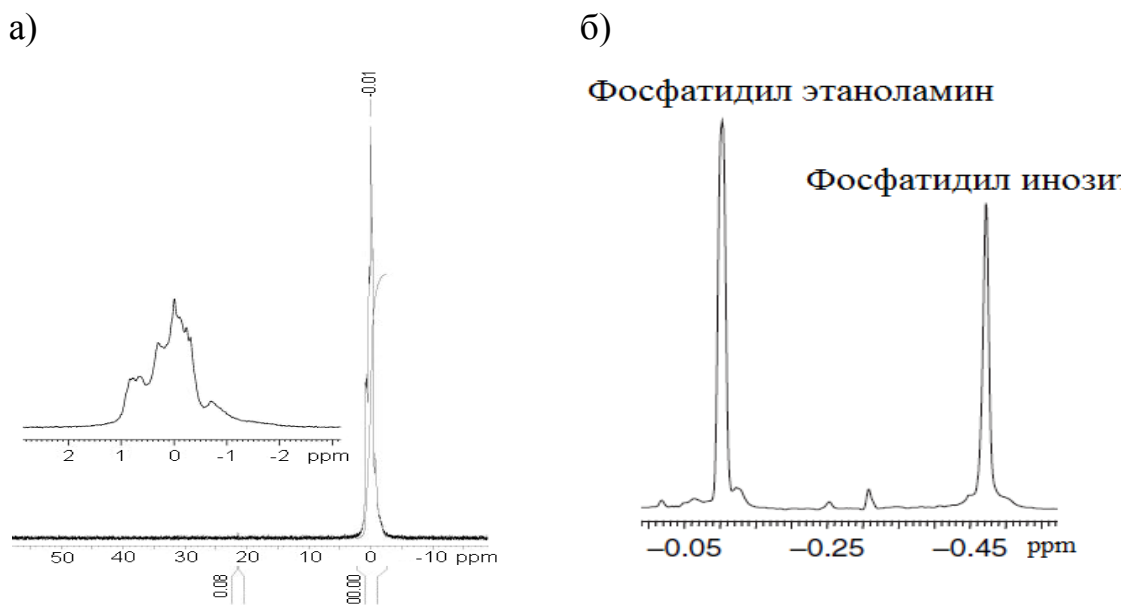


Рис. 3.14. ^{31}P ЯМР-спектры: **а)** комплекс фитиновой кислоты и глюкозамина; **б)** лецитиновая фракция сои (D.-L.M. Tzou, 2005).

Образование комплексов фитиновой кислоты с аминами доказывает и анализ ИК-спектров (табл. 3.6.) твёрдых продуктов реакции $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ с ГА (рис. 3.15) и с ТА (рис. 3.16).

Таблица 3.6.

Данные ИК-спектров продуктов взаимодействия фитиновой кислоты с аминами.

Группа	Волновое число, см^{-1}				
	$\text{InsP}_6\text{H}_{12}$	$[\text{ГАН}]^+\text{Cl}^-$	Комплекс фитиновой кислоты и ГА ($\text{InsP}_6 \cdot 5\text{ГА}$)	ТА	Комплекс фитиновой кислоты и ТА
ОН, ν	3320	3319	3354 3292	3346 3331 3290	3292
С-О спирт.	-	1094 1067 1038	1094 1059 1034	1066 1036 1024	1067 (ш)
NH_3^+ , δ	-	1584 1537	1585 1539	1589	1553
Р-О, ν	889	-	891	-	898
Р=О, ν	1643 1130	-	1618 1138	-	1618 1140

В ИК-спектре комплекса фитиновой кислоты и глюкозамина содержатся полосы всех деформационных и валентных колебаний протонированной формы глюкозамина, валентных колебаний С-О-связи эфирного (1150-1030 см^{-1}), спиртового фрагментов и сахаров (854 см^{-1}). Кроме того, в спектре исчезает полоса Cl^- (774 см^{-1}), появляются полосы, характерные для аниона фитиновой кислоты [63], а именно: колебания Р-О-связи (889 см^{-1}) сдвиг по отношению к продукту $\Delta\nu=2$ см^{-1} , колебания фосфорильной группы 1130 и 1643 см^{-1} (сдвиг в продукте $\Delta\nu=8$ см^{-1}). Отсутствие Cl^- также было подтверждено отрицательной пробой с AgNO_3 .

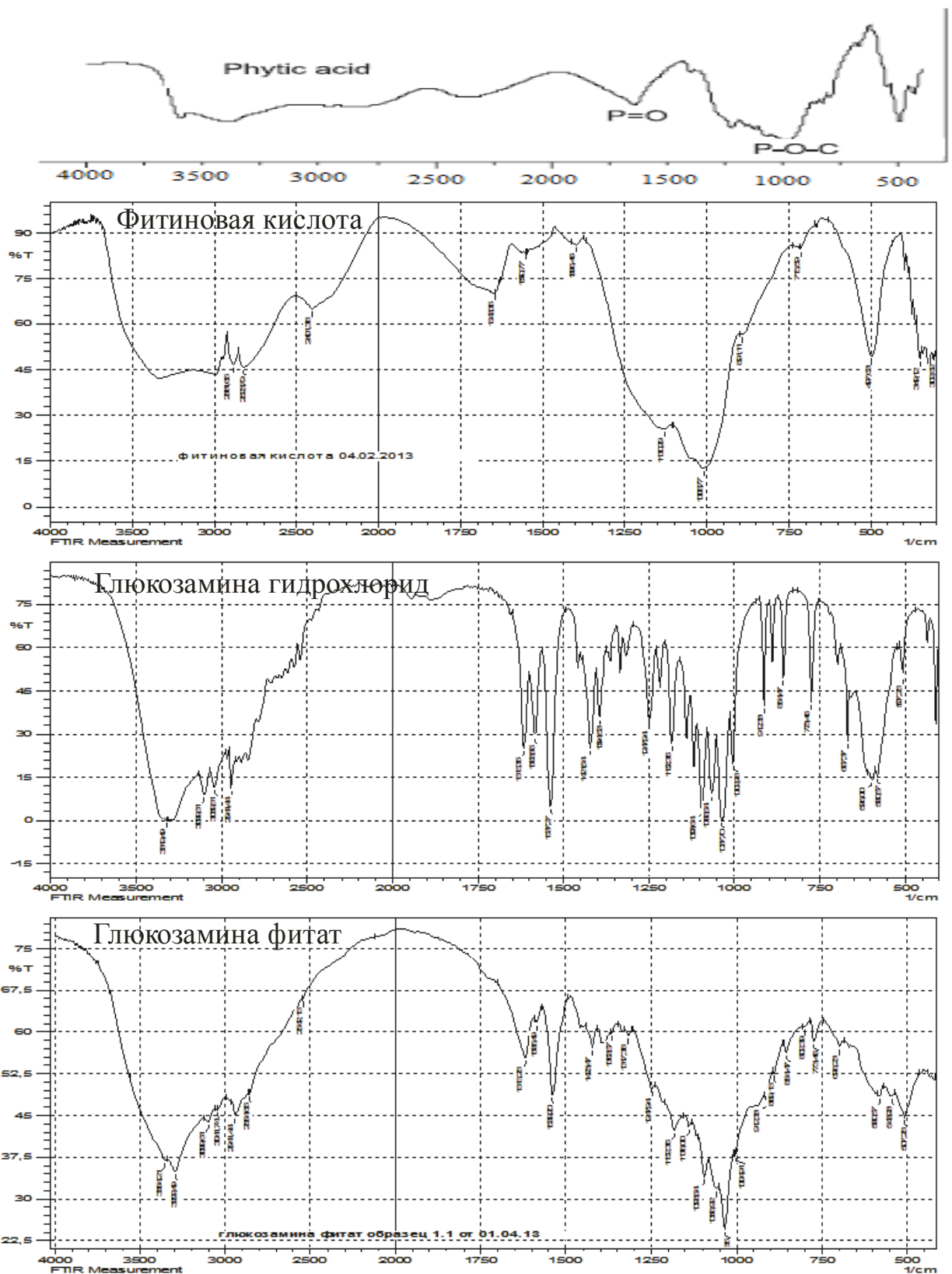


Рис. 3.15. ИК-спектры фитиновой кислоты [63], глюкозамина гидрохлорида, комплекса фитиновой кислоты и глюкозамина (условно – глюкозамина фитат).

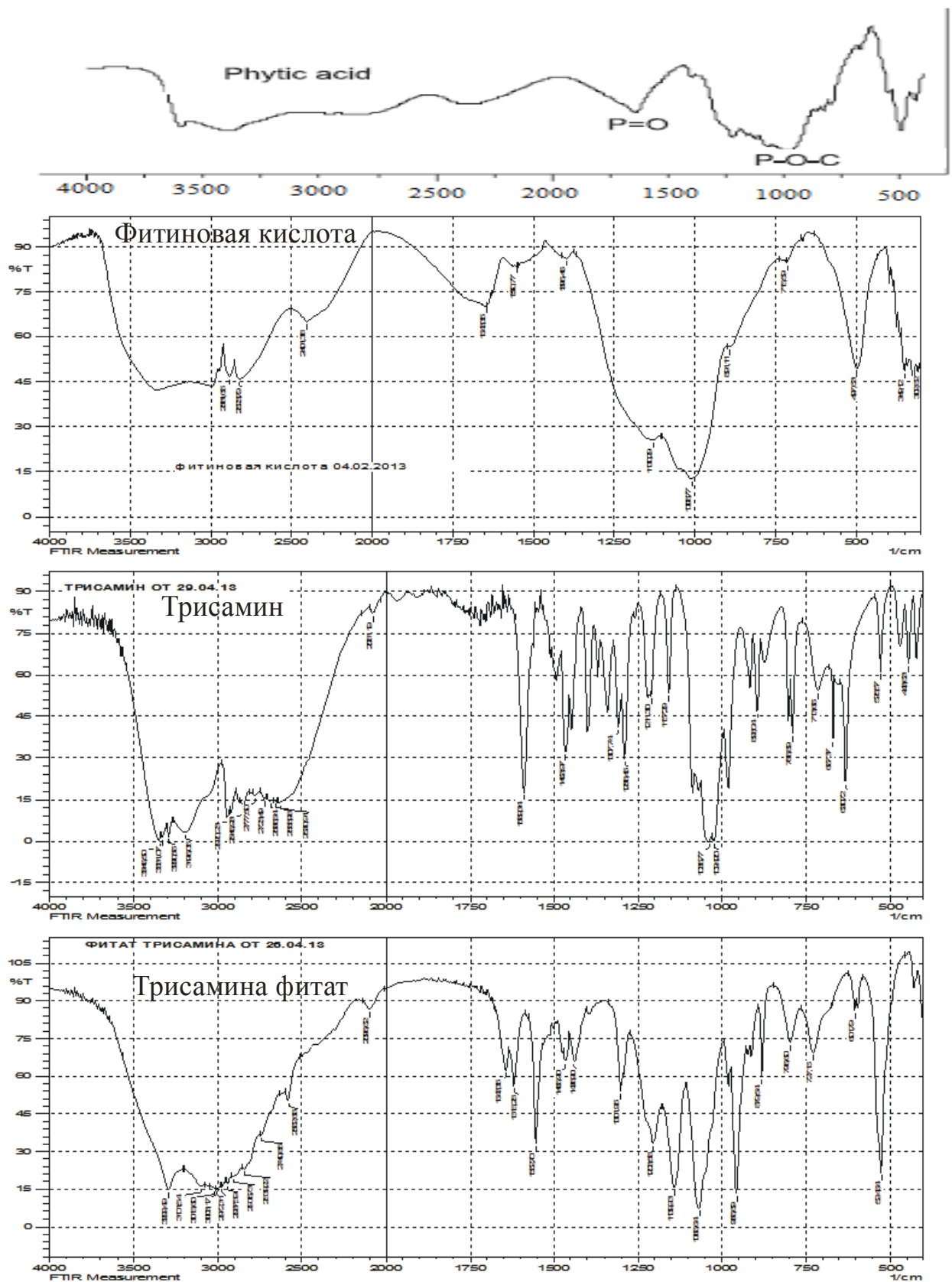


Рис. 3.16. ИК-спектры фитиновой кислоты [63], трисамина и комплекса фитиновой кислоты с трисамином (условно – трисамина фитат).

ИК-спектр продукта взаимодействия фитиновой кислоты и трисамина также содержит полосы, характерные для аниона фитиновой кислоты, отражающие колебания Р-О связи 889 см^{-1} со сдвигом $\Delta\nu$ в продукте относительно исходной фитиновой кислоты, равным 9 см^{-1} . Колебания фосфорильной группы проявляются в виде полосы 1130 см^{-1} , а также в области 1616 см^{-1} , в отличие от валентных колебаний фитиновой кислоты 1643 см^{-1} ($\Delta\nu = 27\text{ см}^{-1}$). Кроме того, выявлены полосы валентных колебаний С-ОН спиртовой связи 1066 см^{-1} и С-О (эфирной) связи – $1130\text{-}1030\text{ см}^{-1}$.

На данном этапе работы проведены исследования, подтверждающие сохранение цикла фосфорилированного сахара InsP_6 (с реактивом Вэйда). Оптическая плотность при 500 нм реакционной смеси фитиновой кислоты и биологически активных аминов оставалась неизменной в широком диапазоне молярных соотношений от 1:1 до 1:12 и соответствовала значению оптической плотности исходного раствора фитиновой кислоты в отсутствие лиганда, что подтверждает сохранение аниона – гексакисфосфатного инозитного фрагмента.

Кроме того, результаты с реактивом Вэйда, аналогичные полученным ранее для комплекса фитиновой кислоты и ксимедона, также говорят о сохранении антиоксидантных свойств фитиновой кислоты в комплексах с трисамином и глюкозамином.

Выводы по пункту 3.2.

Впервые выделены комплексы фитиновой кислоты и ГА и ТА в твёрдом состоянии, структура которых доказана ИК-, ^1H -, ^{13}C - и ^{31}P - ЯМР спектроскопией. Установлено, что реакция $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ с аминами идёт с протонированием, причём взаимодействие с ТА происходит по аминогруппе, а протонированный ГА образует соединение солевого характера. Стехиометрия комплекса зависит от условий приготовления и соотношение ТА : $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ лежит в интервале от 5:1 до 10:1, а для солевого комплекса

фитиновой кислоты и ГА имеет состав $\text{InsP}_6\text{H}_7 \cdot 5\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_5\text{N}$ (элементный анализ по С, N, H, P).

Можно предположить, что комплексы фитиновой кислоты с глюкозамином и трисамином будут не снижать антиоксидантную активность, присущие по литературным данным, фитиновой кислоте, поскольку гексафосфат инозитный фрагмент $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ во всех комплексах остаётся неизменным (эксперименты с реактивом Вэйда).

3.3. Доказательство антиоксидантной активности фитиновой кислоты и её комплексов с аминами

Результаты, полученные с реактивом Вэйда, позволяют прогнозировать высокие антиоксидантные свойства комплексов фитиновой кислоты с аминами, сравнимые со свойствами самой фитиновой кислоты в живом организме, за счёт связывания фитатами $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ по типу реакции комплексообразования ионов металлов с ЭДТА, что, в свою очередь, блокирует цепную реакцию образования разнообразных активных форм кислорода [33, 94, 112], участвующих в процессах ПОЛ. Принципиально эта схема изучена с помощью реакции Фентона *in vitro* на гомогенате слизистой оболочки толстой кишки крыс линии Вистар [131].

Ингибирующее влияние фитиновой кислоты и её комплексов с аминами на процессы липопероксидации было изучено на модели цельной консервированной крови в условиях *in vitro*.

3.3.1. Изучение влияние фитиновой кислоты на баланс про- и антиоксидантных систем крови

В настоящее время в зарубежной литературе широко обсуждаются антиоксидантные эффекты фитиновой кислоты, лежащие в основе

механизмов её действия, в том числе в составе противоопухолевой терапии [49, 90, 106]. Показано, что она способна полностью предотвращать железо-катализируемое образование радикалов, что отличает её от других химических соединений, проявляющих антиоксидантную активность [94]. Изучена и доказана эффективность фитиновой кислоты в снижении активности липопероксидации в клетках печени, в частности, при моделировании алкоголь-индуцированного стресса [115].

Антиоксидантные свойства растворов фитиновой кислоты различных концентраций в настоящей работе изучались методом биохемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона. В таблице 3.7 представлены данные, полученные условиях *in vitro* на плазме крови человека при воздействии растворов фитиновой кислоты концентраций 5, 10,30 и 100 мМ.

Таблица 3.7.

Показатели СРО плазмы крови при воздействии растворов фитиновой кислоты различных концентраций.

Опыт	Интенсивность СРО по Фентону (ПОЛ)			Скорость нормализации СРО (АОА)
	Светосумма вспышки (S, мВ·с)	Интенсивность вспышки (I _{max} , мВ)	K=I _{max} /S	tgα ₂
Контроль	9,6550 ± 0,4833	1,1395 ± 0,0290	0,1180	0,3940 ± 0,0107
5 мМ	12,3800 ± 0,5667	1,3150 ± 0,0447	0,1062	0,4130 ± 0,0220
10 мМ	13,8150 ± 0,3967	1,4325 ± 0,0190	0,1037	0,4770 ± 0,0067
30 мМ	14,5150 ± 0,8700	1,3090 ± 0,1107	0,0902	0,3630 ± 0,0353
100 мМ	17,2000 ± 0,9067	1,3655 ± 0,1663	0,0794	0,3625 ± 0,0323

Анализ интенсивности липопероксидации в плазме крови контрольного и опытных образцов (значение светосуммы вспышки; S, мВ·с) позволил установить, что введение фитиновой кислоты обуславливает нарастание данного параметра от 28% до 79% по отношению к контролю при воздействии минимальной (5mM) и максимальной (100mM) дозами соответственно ($p < 0,05$), что говорит о прямой линейной зависимости увеличения перекисного окисления липидов при увеличении дозы препарата.

Вместе с тем, интенсивность свободно радикального окисления (CPO) линейно уменьшается, что, по-видимому, связано с угнетением эндогенного пула антиоксидантных систем крови при воздействии растворов 30 и 100 mM концентраций (рис.3.17).

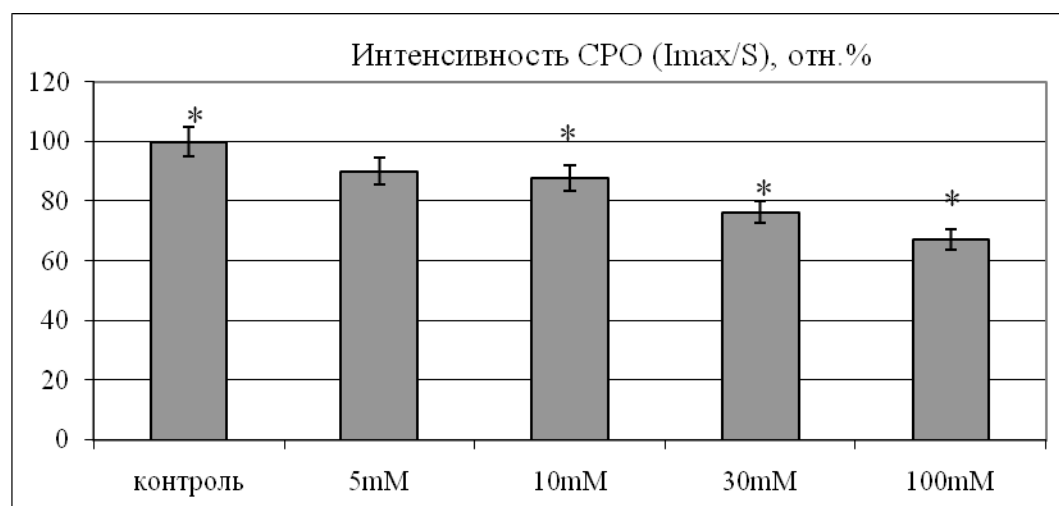


Рис. 3.17. Интенсивность свободно-радикального окисления липидов в плазме крови при действии растворов фитиновой кислоты («*» – уровень статистической значимости различий $p < 0,05$).

Анализ общей антиоксидантной активности (рис. 3.18) показал, что максимальная общая антиоксидантная активность регистрируется при введении в образцы крови водных растворов фитиновой кислоты с концентрацией 10 mM и составляет 21% по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Добавление большей дозы препарата вызывает заметное уменьшение антиоксидантных резервов крови вплоть до значений ниже контрольного ($p < 0,05$).

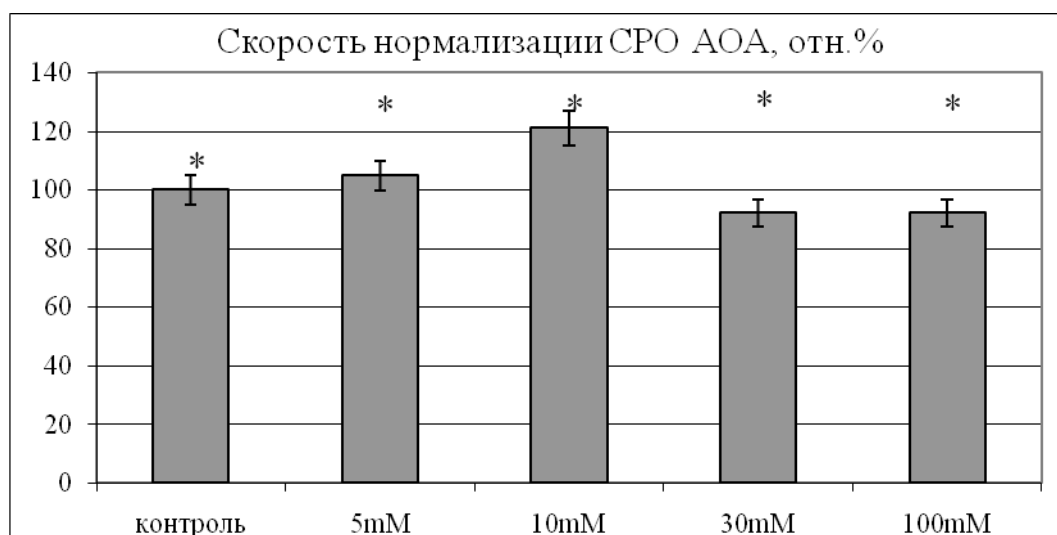


Рис. 3.18. Общая антиоксидантная активность плазмы крови при действии растворов фитиновой кислоты («*» – уровень статистической значимости различий $p < 0,05$).

Для подтверждения достоверности полученных данных, регистрировали содержание одного из продуктов ПОЛ – концентрацию малонового диальдегида в плазме всех образцов крови (рис. 3.19). По результатам проведенного эксперимента, в плазме регистрировали нарастание концентрации малонового диальдегида при воздействии минимальной дозы фитиновой кислоты (5 mM), которая составляла 33% по сравнению с контролем. Добавление фитиновой кислоты с концентрацией 10 mM показала более умеренное значение МДА и составила 29%. Дальнейшее увеличение дозы фитиновой кислоты вызывало ожидаемое повышение концентрации малонового диальдегида в плазме крови в 1,5 и 2,9 раза при использовании 30 mM и 100 mM растворов соответственно ($p < 0,05$). Таким образом, нами выявлено, что эффекты 5 – 30 mM растворов фитиновой кислоты в отношении перекисного окисления липидов при введении её в образцы крови носят адаптивный характер, оптимизируя функционирование системы «про-/антиоксиданты». Использование 100 mM раствора заметно смещает равновесие системы в сторону проантиоксидантных свойств.

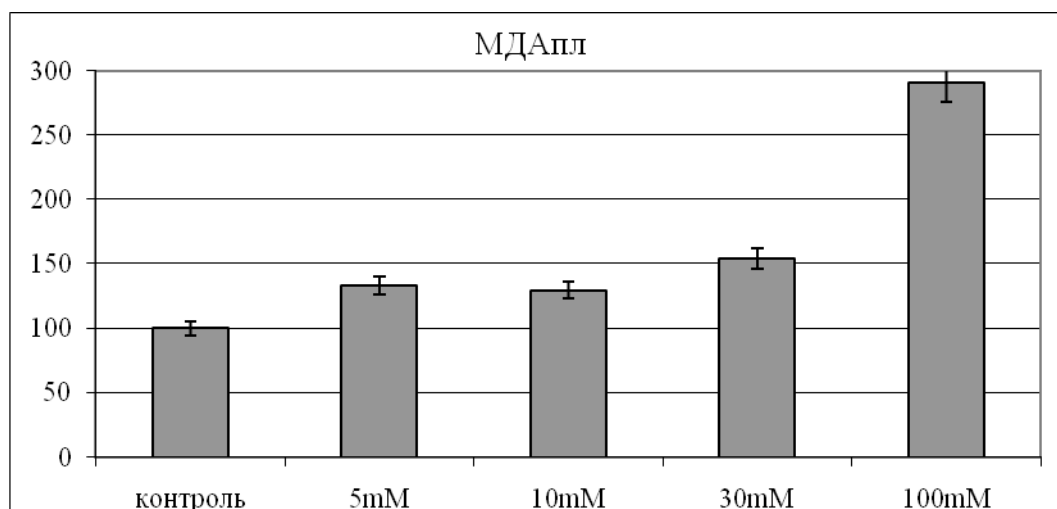


Рис. 3.19 Концентрация малонового диальдегида в плазме крови при действии растворов фитиновой кислоты.

Кроме того в работе проводилась оценка активности фермента супероксиддисмутазы (СОД). Анализ данных показал увеличение активности супероксиддисмутазы при добавлении 5 и 10 mM растворов фитиновой кислоты в 1,7 и 2,5 раза ($p < 0,05$) соответственно (рис.3.20).

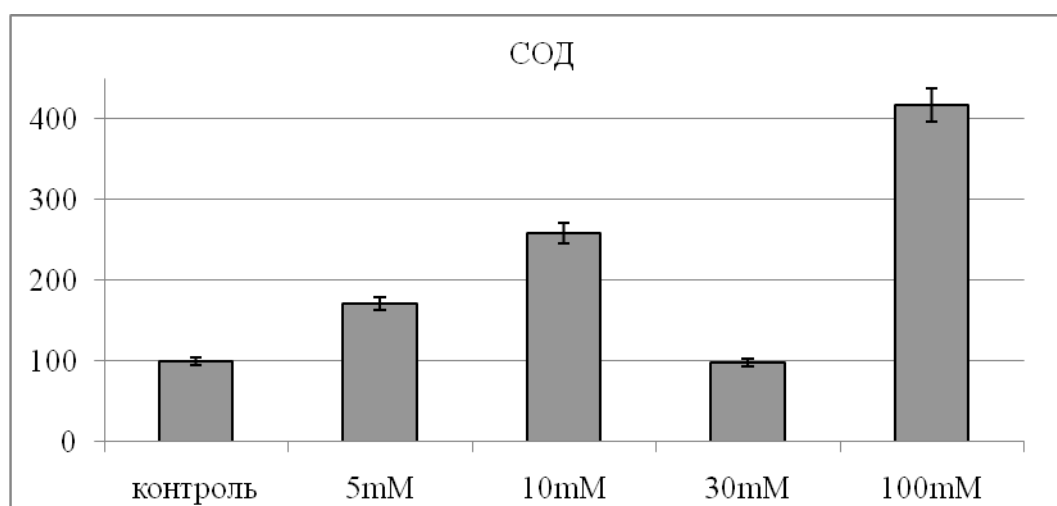


Рис. 3.20. Активность супероксиддисмутазы крови при действии растворов фитиновой кислоты.

Использование раствора с концентрацией 30 mM приводило к умеренному угнетению активности энзима. Вместе с тем, использование 100 mM раствора фитиновой кислоты показывало выраженную модуляцию

каталитической активности фермента – в 4 раза по сравнению с контролем, связанную, по-видимому, полным подавлением эндогенного пула антиоксидантных систем крови этой дозой препарата.

Результатом данного этапа работы стало подтверждение выраженных антиоксидантных свойств фитиновой кислоты в условиях *in vitro* проявляющихся на фоне умеренной активизации процессов липопероксидации, которые, по видимому несут адаптивный характер. Выявлено, что фитиновая кислота обладает дозозависимой антиоксидантной активностью, благодаря чему способна в условиях *in vitro* пополнять пул эндогенных антиоксидантов крови.

Сопоставление полученных данных (ПОЛ, АОА, МДАпл, СОД), позволило выявить, что раствор фитиновой кислоты с концентрацией 10 мМ, наиболее оптимально активизирует про- и антиоксидантный баланс крови, что позволяет нам использовать эту концентрацию для получения комплексов фитиновой кислоты и аминов.

3.3.2. Сравнительный анализ антиоксидантных эффектов комплексов фитиновой кислоты с аминами

Для изучения антиоксидантных свойств комплексов фитиновой кислоты с аминами были приготовлены растворы, содержащие 10 мМ фитиновую кислоту к которой в соотношении 1:5, 1:6 и 1:10 были прибавлены растворы глюкозамина, ксимедона и трисамина соответственно. В условиях *in vitro* на плазме крови человека методом биохемилюминесценции показано, что интенсивность свободно радикального окисления (СРО) умеренно увеличивается при введении в систему $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ и её комплексов с аминами, что должно характеризовать усиление процессов липопероксидации под влиянием комплексов фитиновой кислоты с аминами по сравнению с образцом, содержащим фитиновую кислоту (табл.3.8, рис.3.21).

Таблица 3.8.

Показатели СРО плазмы крови при воздействии фитиновой кислоты и её комплексов с аминами.

Опыт	Интенсивность СРО по Фентону (ПОЛ)			Скорость нормализации СРО (АОА)
	Светосумма вспышки (S, мВ·с)	Интенсивность вспышки (I _{max} , мВ)	K=I _{max} /S	tgα ₂
Контроль	9,7867 ± 0,0468	1,3117 ± 0,0393	0,1340 ± 0,0110	0,4200 ± 0,0630
InsP ₆ H ₁₂	13,4600 ± 0,0415	1,5293 ± 0,0327	0,1136 ± 0,0367	0,5473 ± 0,0438
ТА+InsP ₆ H ₁₂	11,9133 ± 0,0042	1,6760 ± 0,0438	0,1406 ± 0,0356	0,5643 ± 0,0057
ГА+InsP ₆ H ₁₂	12,4133 ± 0,0308	1,6440 ± 0,0251	0,1324 ± 0,0068	0,5452 ± 0,0470
Кси+InsP ₆ H ₁₂	11,8000 ± 0,0420	1,3777 ± 0,0301	0,1167 ± 0,0443	0,5460 ± 0,0240

Однако скорость нормализации СРО, рассчитываемая как величина отношения tgα₂образца/tgα₂контроля (в процентах) и определяемая нами как общая антиоксидантная активность (АОА) увеличивается (табл.3.8, рис.3.21).

Полученные результаты, по СРО, вероятно, можно объяснить как ответную реакцию биологической системы на интенсификацию свободнорадикального окисления (проявление проантиоксидантного эффекта). Однако, на наш взгляд, увеличение показателей интенсивности СРО, ответственных за ПОЛ, объясняется также ролью InsP₆H₁₂ как хелатора ионов железа (Fe²⁺ и Fe³⁺) при инициации в реакции Фентона. Свойства InsP₆H₁₂ как хелаторов ионов железа были использованы нами при выборе доз препаратов для исследования, используя известную методику с железокатехольным комплексом [94].

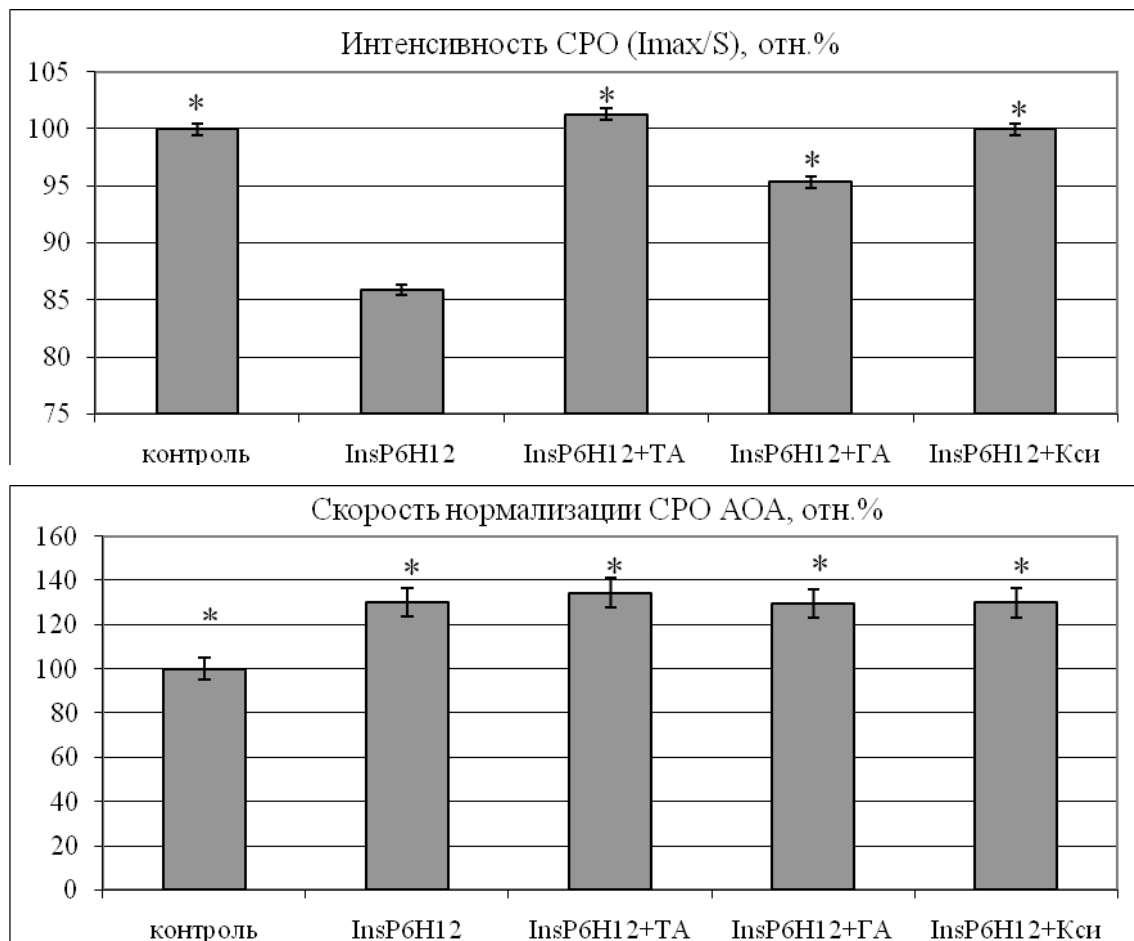


Рис.3.21. Влияние исследуемых растворов на интенсивность и скорость нормализации свободно-радикального окисления в плазме крови («*» – уровень статистической значимости различий $p < 0,05$).

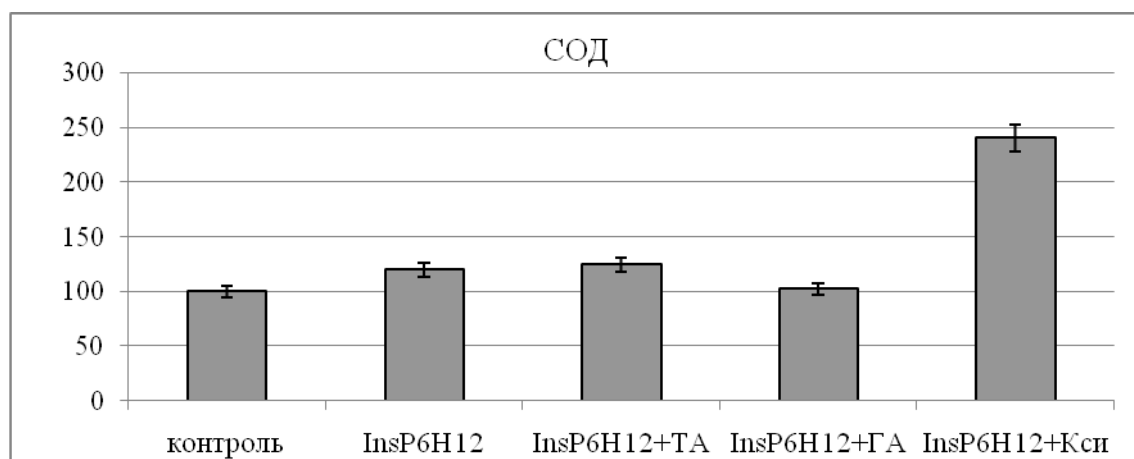


Рис.3.22. Активность супероксиддисмутазы крови при действии исследуемых растворов.

Анализ данных активности СОД, ингибирующей образование супероксид-аниона позволяет нам подтвердить полученные данные общей антиоксидантной активности. Показано достоверное увеличение каталитической активности СОД как в присутствии $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$, так и её комплексов (рис. 3.22).

Таким образом, антиоксидантная активность комплексов Кси, ТА, ГА в исследованиях *in vitro* на плазме крови человека подтверждается и по значительному положительному влиянию на активность СОД.

3.3.3. Выбор дозы фитиновой кислоты для образования комплекса с ксимедоном

Среди комплексов фитиновой кислоты с аминами особый интерес представляет соединение с Кси, как основной действующий компонент гидрофильных противоожоговых гелей. Выбор концентраций $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$, Кси и их комплекса был выполнен на основании известной методики [94], в соответствии с которой изучается взаимодействие железо-катехольного комплекса с хелаторами (соединениями способными вытеснить железо из катехольного комплекса).

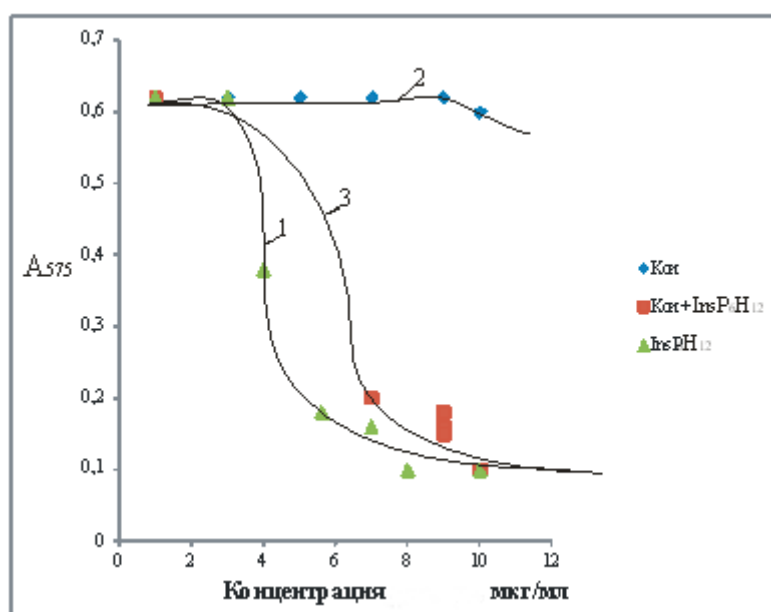


Рис. 3.23.
Взаимодействие железо-катехольного комплекса с:
1 - фитиновой кислотой;
2- ксимедоном;
3- комплексом фитиновой кислоты и ксимедона

Как следует из рисунка 3.23, ксимедон не способен влиять на стабильность железо-катехольного комплекса (кривая 2) во всём диапазоне представленных концентраций. В соответствии с методикой, доза определяется по концентрации фитиновой кислоты как лиганда, способного вытеснить катехол из его комплекса с железом. Из рисунка видно, что оптическая плотность растворов железо-катехольного комплекса резко уменьшается от 0,62 до 0,1 в области концентраций как фитиновой кислоты так и её комплекса с ксимедоном от 4 до 8 мкг/мл. Доза фитиновой кислоты в этом случае соответствовала концентрации фитиновой кислоты на плато и составила 8-10 мкг/мл.

3.3.4. Изучение антиоксидантной активности комплексов фитиновой кислоты и ксимедона

В сравнительном исследовании влияния комплексов фитиновой кислоты с аминами показано, что в водных растворах комплекс с Кси не только сохраняет антиоксидантные свойства, присущие фитиновой кислоте, но и усиливают этот эффект, что объясняется, по видимому, дополнительными антиоксидантными свойствами Кси, в частности, способностью индуцировать активность печеночных оксидаз. В связи с этим, нами осуществлена оценка общей антиоксидантной активности Кси, фитиновой кислоты и их комплексов, включающая, в том числе, их влияние на активность СОД.

На рис. 3.24 приведены результаты интенсивности свободно-радикального окисления (СРО), инициируемого реакцией Фентона, рассчитываемые по результатам хемиллюминесценции (табл. 3.9).

На основании данных биохемиллюминесцентного исследования образцов крови показано, интенсивность СРО процесса при воздействии испытуемых веществ падает (рис. 3.24).

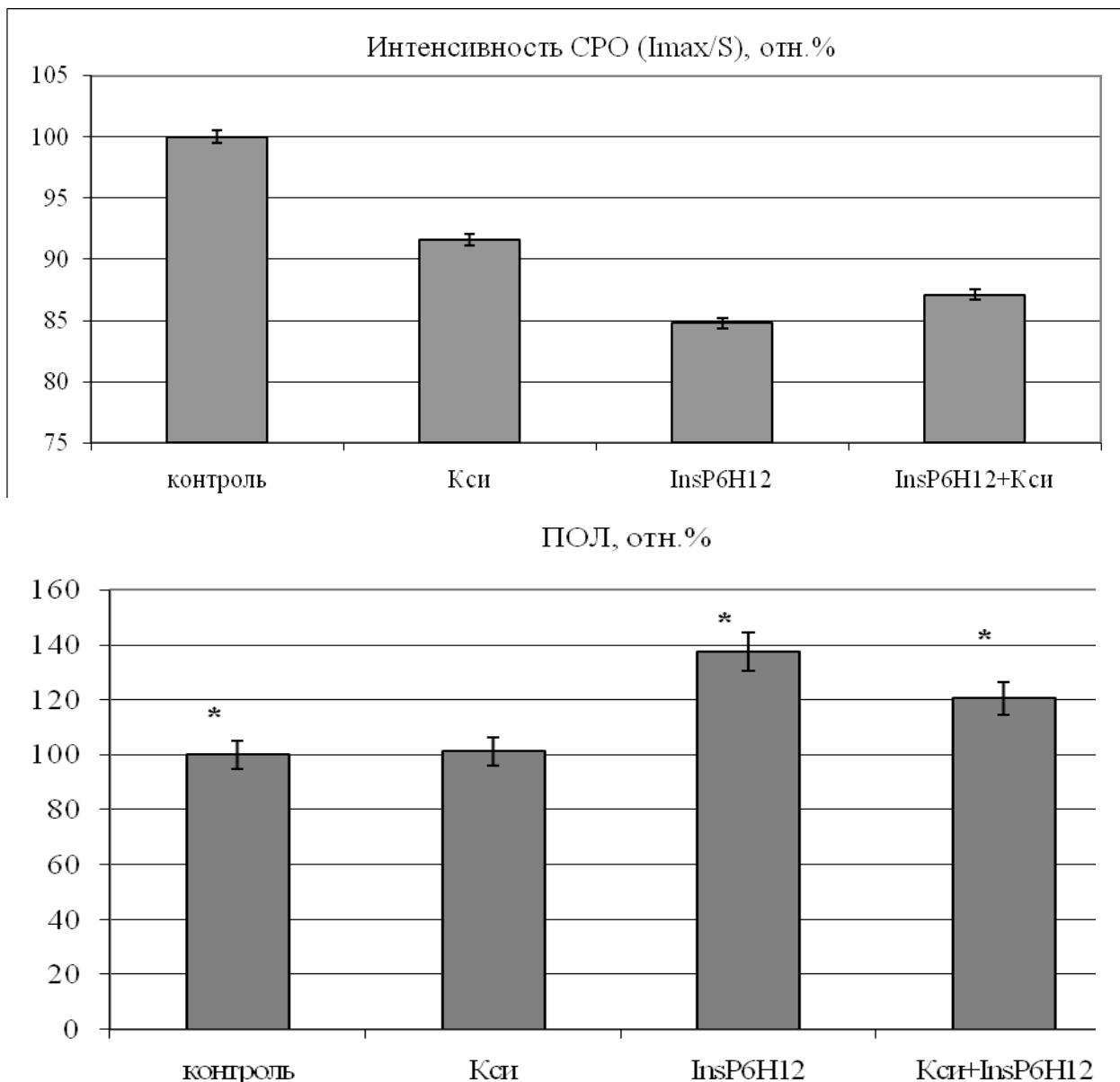


Рис. 3.24. Влияние исследуемых растворов на интенсивность перекисного окисления липидов в плазме крови; «*» – уровень статистической значимости различий $p < 0,05$.

Отношение $S_{\text{образца}} / S_{\text{контроля}}$ в процентах условно обозначено нами как ПОЛ. Из данных таблицы 3.9 видно, что комплекс $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ и Кси умеренно повышает интенсивность ПОЛ в плазме крови (на 21%; $p < 0,05$), тогда как под действием только фитиновой кислоты указанный показатель возрастает более выражено (на 38%; $p < 0,05$). Следует отметить, что при этих же условиях раствор Кси практически не изменяет значение рассматриваемого параметра по сравнению с контрольным уровнем.

Таблица 3.9.

Показатели скорости радикального окисления плазмы крови.

Опыт	Интенсивность СРО по Фентону (ПОЛ)			Скорость нормализации СРО (АОА)
	Светосумма вспышки (S, мВ·с)	Интенсивность вспышки (Imax, мВ)	K=Imax/S	tg α_2
Контроль	9,7867 ± 0,0468	1,3117 ± 0,0393	0,1340 ± 0,0110	0,4200 ± 0,0630
Кси	9,9200 ± 0,0965	1,2177 ± 0,0107	0,1227 ± 0,0639	0,4667 ± 0,0058
InsP ₆ H ₁₂	13,4600 ± 0,0415	1,5293 ± 0,0327	0,1136 ± 0,0367	0,5473 ± 0,0438
Кси+InsP ₆ H ₁₂	11,8000 ± 0,0420	1,3777 ± 0,0301	0,1167 ± 0,0443	0,5460 ± 0,0240

Учитывая тот факт, что фитиновая кислота способна выступать в качестве хелатора к ионам железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}) в реакции Фентона, показатели S и Imax будут отражать конкурентные процессы липопероксидации и дополнительную хемилюминесценцию, вызванную фитатами железа. По этой причине, более целесообразно привлечь величину tg α_2 , показывающую скорость нормализации свободно-радикального окисления, как характеристику антиоксидантной активности (АОА). В работе использован показатель tg $\alpha_{2\text{образца}} / \text{tg } \alpha_{2\text{контроля}}$ в процентах (рис. 3.25).

Установлено, что комплекс InsP₆H₁₂ и ксимедона, как и сама фитиновая кислота, проявляют максимальную антиоксидантную активность в плазме крови по сравнению с контролем, повышая ее на 31 и 30% соответственно ($p < 0,05$ для обоих случаев). При действии водного раствора Кси данная тенденция выражена в меньшей степени (рис. 3.25). При этом нарастание уровня показателя происходит только на 11,3% относительно интактного образца биологической жидкости, однако является статистически значимой ($p < 0,05$).

Скорость нормализации СРО АОА, отн. %

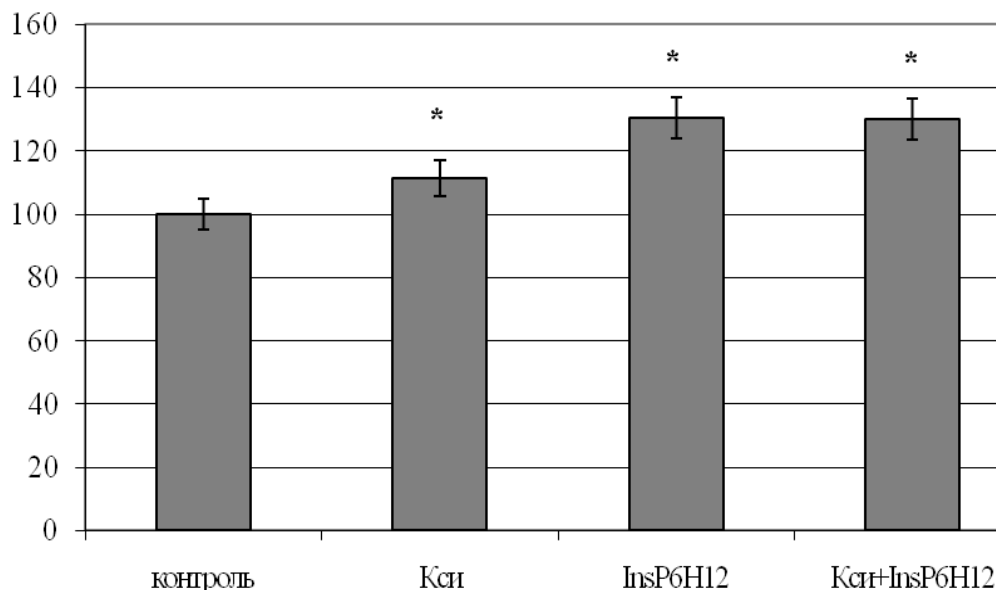


Рис. 3.25 Общая антиоксидантная активность плазмы крови при действии исследуемых растворов; «*» – уровень статистической значимости различий $p < 0,05$.

Сопоставление динамики изменения АОА и ПОЛ позволило установить умеренную антиоксидантную активность Кси, реализующуюся за счет повышения АОА крови (на 11,3%) при сохранении исходного уровня интенсивности процессов липопероксидации на фоне введения данного соединения в образцы крови *in vitro*. Это подтверждает результаты других авторов [14, 15, 41]. Подобные сдвиги окислительного метаболизма крови, по нашему мнению, характеризуют лишь временное увеличение пула антиоксидантов плазмы за счет экзогенно введенного вещества без инициации собственных механизмов.

Действие фитиновой кислоты способствует более сбалансированному нарастанию ПОЛ и АОА (на 37 и 30% соответственно; $p < 0,05$), что, вероятно, характеризует адекватность ответа про- и антиоксидантных систем крови здорового человека при введении этого вещества.

Наиболее отчетливая динамика параметров выявлена для тестируемого водного раствора комплекса. Выраженное превалирование его

стимулирующего действия на АОА над степенью инициации ПОЛ (увеличение уровня показателей на 20 и 30% относительно контрольного образца; $p < 0,05$ для обоих случаев) позволяет охарактеризовать рассматриваемый комплекс как соединение, обладающее преимущественно антиоксидантным действием.

Следует учесть, что при использовании метода хемилюминесценции для оценки антиоксидантной активности изменение показателей интенсивности ПОЛ, возможно, обусловлено ответной реакцией на интенсификацию свободнорадикального окисления.

На данном этапе исследования дополнительно изучено содержание первичных продуктов липопероксидации, таких как диеновые и триеновые конъюгаты (ДК и ТК, соответственно) а также конечных продуктов – оснований Шиффа (ОШ) методом флуоресценции при длине волны возбуждения 365нм и длине волны эмиссии 420нм. Анализ полученных данных показал, что после добавления в систему $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$, или её комплекса с Кси, происходит снижение как первичных, так и конечных продуктов ПОЛ – достоверное снижение ДК и ТК, соответственно на 24 и 42%. Содержание конечных продуктов ПОЛ – ОШ снизилось на 46% (табл.3.10).

Таблица 3.10.

Показатели перекисного окисления липидов плазмы крови по данным хемилюминесценции после воздействия ксимедона, фитиновой кислоты и их комплекса

Группы	Показатели перекисного окисления липидов		
	ДК	ТК	ОШ
Контроль	0.210±0.011	0.041±0.002	4.24±0.69
Фитиновая кислота	0.201±0.016	0.031±0.003	3.18±0.65
Комплекс фитиновой кислоты и ксимедона	0.160±0.011 *	0.023±0.010 *	2.17±0.51 *

* - достоверность различия по сравнению с состоянием больных до лечения ($p \leq 0.05$)

Приведенную тенденцию подтверждают и результаты оценки активности СОД (рис. 3.26), которые свидетельствуют о выраженной ее стимуляции (в 2,4 раза по сравнению с контролем; $p < 0,05$ для обоих случаев), не наблюдающейся при введении в образцы крови I в индивидуальном виде. Интересно, что ксимедон, напротив, способствует умеренному ингибированию активности этого фермента (на 43% относительно контроля; $p < 0,05$), что можно объяснить как компенсаторный ответ биологической системы на введение экзогенного соединения с антиоксидантными свойствами.

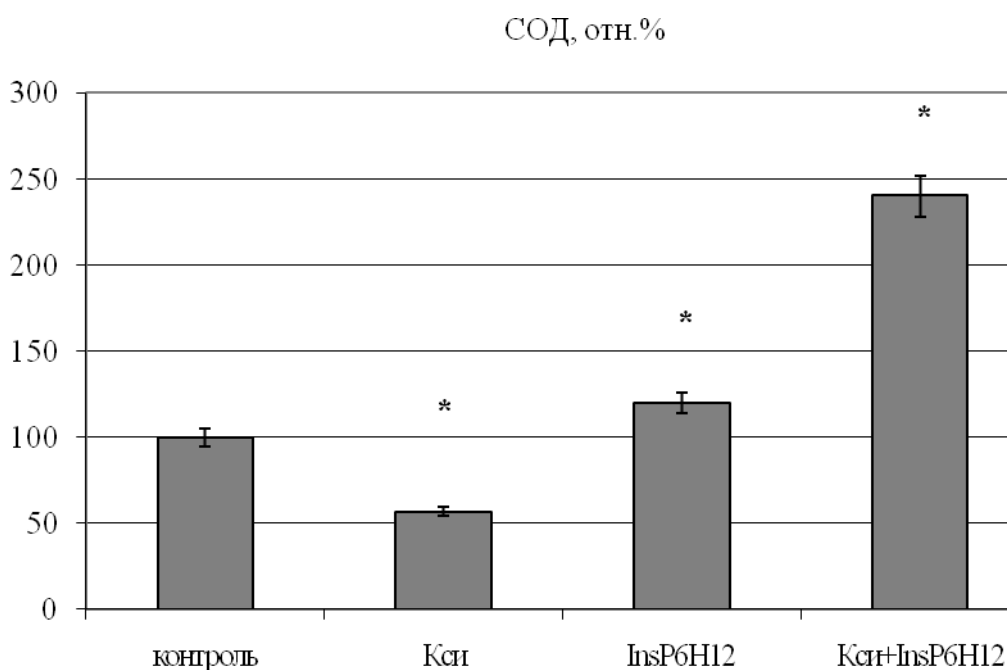


Рис. 3.26. Активность супероксиддисмутазы крови при действии исследуемых растворов; «*» – уровень статистической значимости различий $p < 0,05$.

Таким образом, результаты проведенных исследований *in vitro* в плазме крови человека показывают синергетический эффект действия Кси и $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ в водном растворе комплекса по таким показателям, как общая антиоксидантная активность и активация каталитической активности СОД.

ГЛАВА 4. Разработка противоожогового геля комплекса фитиновой кислоты и ксимедона.

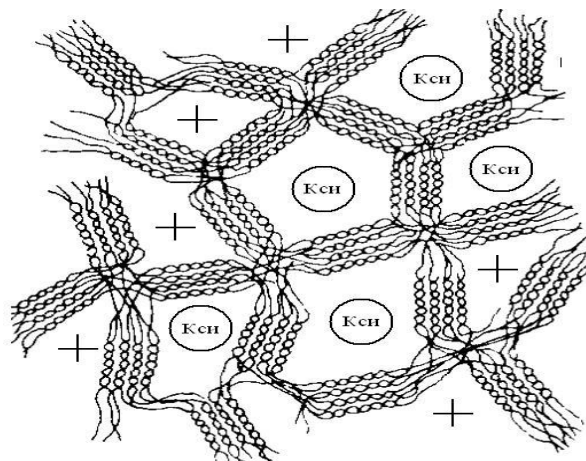
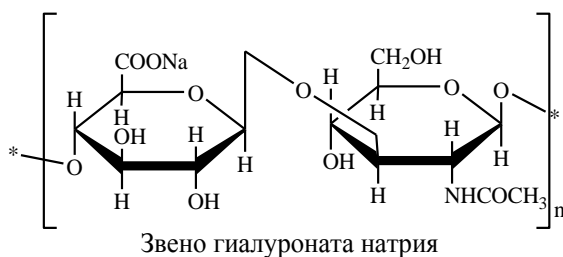
4.1. Обоснование состава и лабораторной технологии приготовления геля

В качестве гелеобразователя нами была выбрана высокомолекулярная натриевая соль гиалуроновой кислоты с молекулярной массой около миллиона, хорошо зарекомендовавшая себя как компонент, способствующий регенерации различных тканей [20, 21, 27]. Ранее, сотрудниками кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ГБОУ ВПО НИЖГМА было показано [21, 27], что гиалуронат натрия образует полиме-коллоидные комплексы ксимедоном в широком диапазоне концентраций как ксимедона, так и полимера. На основании зависимостей вязкости, электропроводности от концентрации компонентов, а также репаратных свойств при лечении ожогов, полученными авторами работы [21], было показано преимущество использования гиалуроната натрия в интервале концентраций 0,8 – 1,0%, перед такими гелеобразователями, как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы и синтетические редкосшитые сополимеры акриловой кислоты (марки карбопол, карбомер) в гелях с ксимедоном.

Натрия гиалуронат и натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы в системе с ксимедоном играют роль гелеобразователя и структурной сетки не приводя к каким-либо серьезным межмолекулярным взаимодействиям.

Взаимодействие ксимедона натрия гиалуронатом, вероятно, происходит по спиртовым группам сахаров. В результате такого взаимодействия образуются полимер-коллоидные комплексы.

Кроме того, гиалуроновая кислота, имеющая двухспиральную сетчатую структуру, способна захватывать основания и отрицательно заряженные частицы внутрь ячеек, что способствует повышению электропроводности в структурированной системе.



В полимер-коллоидных системах на основе гиалуроната натрия, гиалуронат натрия выступает вектором доставки комплекса фитиновой кислоты и ксимедона, что позволяет снизить концентрацию действующих веществ для достижения необходимого фармакологического эффекта.

Влияние фитиновой кислоты на эффективность действия гидрофильных гелей было изучено при сравнении с ранее разработанными составами гелей ксимедона [4, 37].

Концентрацию фитиновой кислоты была выбрана на основании данных в эксперименте а животных и составляла от 2,5 до 6 % при постоянной концентрации ксимедона, равной 10% (табл. 4.1), что показывало наилучшие репаратные свойства в ранее проведенных исследованиях [27].

Эксперименты на животных проводили с комбинированным гелем ксимедона и фитиновой кислоты (состав 3), обеспечивающим максимальную осмотическую активность. Для изучения влияния фитиновой кислоты использовали гели состава 4, а в качестве эталона сравнения использовали гель ксимедона состава 5.

Эффективность высвобождения компонентов геля – фитиновой кислоты, ксимедона и их комплекса – из полимер-коллоидного комплекса с натрия гиалуронатом оценивали методом диализа в соответствии с методикой, утвержденной ФГБУ «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Диализ проводили с использованием полупроницаемой целлофановой мембраны до установления постоянной массы исследуемых

гелей (И.М.Перцев, 1979). Результаты исследований представлены в таблице 4.1.

В качестве консерванта выбран метилпарабен (нипагин), способный в нейтральной среде ($pH \approx 6,5$) проявлять антимикробные и фунгицидные свойства.

Концентрация трисамина в составах соответствовала величине, при которой значение pH были близки к физиологическим ($pH 6,5$). Нормализация pH среды, вероятно, происходит за счёт связывания подвижных протонов фитиновой кислоты основанием – трисамином.

Таблица 4.1.

Составы и свойства гидрофильных гелей на основе, содержащей 1% натрия гиалуроната,

№	Состав, масс. %			Степень высвобождения ксимедона фитата* в %	Относительная осмотическая активность* в %
	Фитиновая кислота	Ксимедон	Трисамин		
1	2,5	10,0	5,0	15	150
2	5,0	10,0	2,0	30	200
3	6,0	10,0	1,0	50	250
4	6,0	-	12,0	-	250
5	-	10,0	-	30	130

* - время эксперимента – 3 часа.

Из данных таблицы 4.1 следует, что фитиновая кислота увеличивает относительную осмотическую активность действующего компонента геля, что, вероятно, объясняется высокой способностью фитат аниона связывать и удерживать воду. Вместе с тем, фитиновая кислота способствует более эффективному высвобождению ксимедона из геля.

На основании данных таблицы 4.1 выбран следующий состав, масс. %:

Гиалуронат натрия	0,90
Этанол (96%)	0,80
Нипагин	0,08

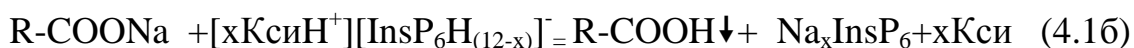
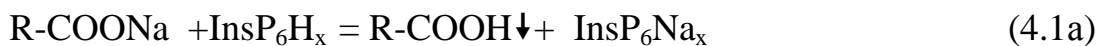
Фитиновая кислота (50%)	12,00
Ксимедон	10,00
Трисамин	1, 00
Вода	до 100,00

4.2 Разработка методик установления подлинности и количественного определения активных компонентов в лекарственной форме «Ксифит»

Контроль качества в сложной лекарственной форме в виде геля предполагает проведение оптимальной пробоподготовки для каждого вида анализа и количественное определение активных компонентов с использованием методов модельных смесей.

4.2.1. Разработка пробоподготовки для проведения анализа действующих веществ гидрофильного геля «Ксифит»

Натрия гиалуронат представляет собой высокомолекулярное соединение, создающее коллоидную систему, что препятствует проведению количественного определения фитиновой кислоты. Основной причиной сложности пробоподготовки является взаимодействие протонов фитиновой кислоты с ионами натрия, в следствие чего снижается растворимость, поскольку образующаяся гиалуроновая кислота намного хуже растворима в воде.



Этот процесс лёг в основу разработанной нами пробоподготовки. Натрия гиалуронат из геля предложено удалять путём высаливания его ацетонитрилом в среде соляной кислоты за счёт образования менее растворимой гиалуроновой кислоты. Кроме того, в этом случае возможны такие процессы как коагуляция и флокуляция гиалуроната натрия под действием сильного электролита – соляной кислоты.

Способ пробоподготовки представлен на схеме 4.1 и включает следующие стадии:

I стадия пробоподготовки включает получение базового 1% раствора геля в 1 М хлороводородной кислоты, который в дальнейшем используется для анализа всех остальных компонентов.

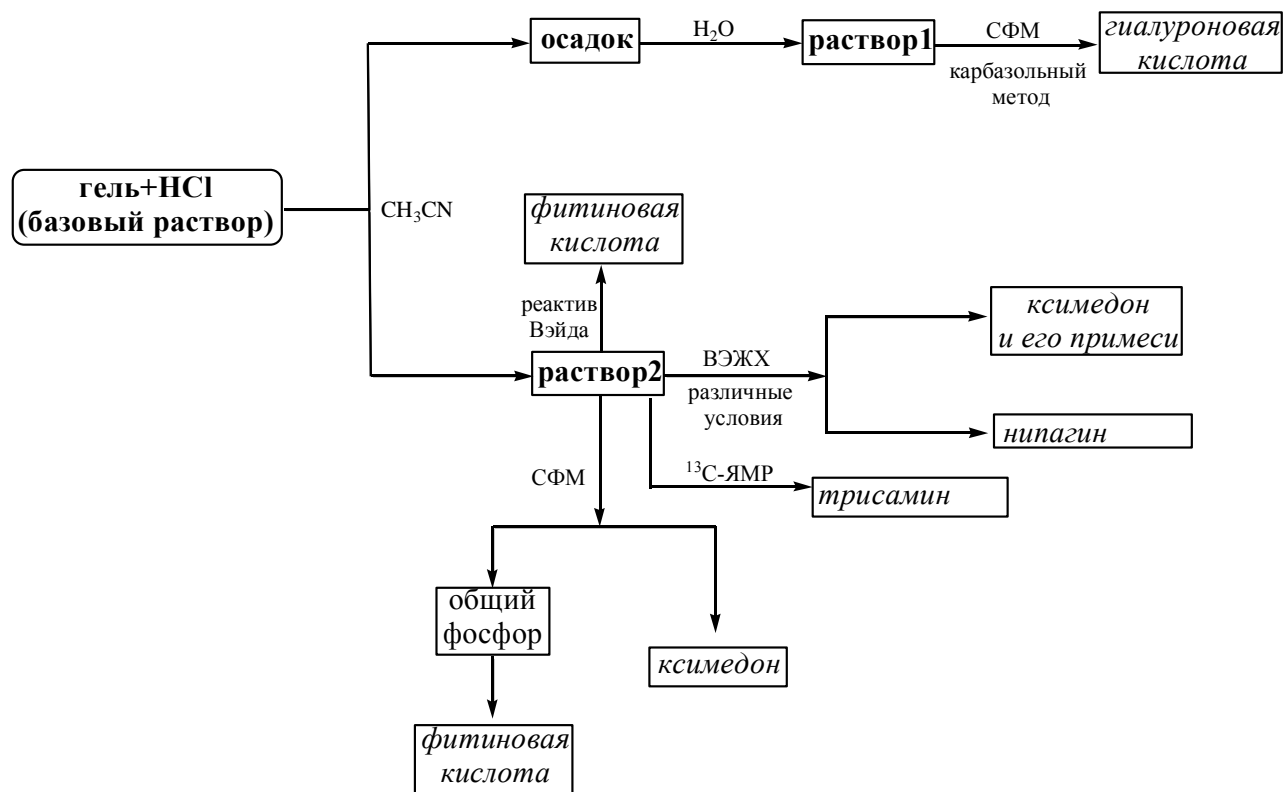
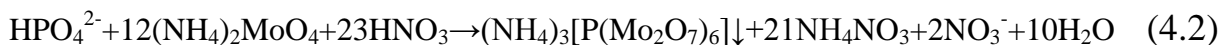


Схема 4.1. Общая схема установления подлинности и количественного содержания основных компонентов гидрофильного геля «Ксифит».

II стадия включает осаждение натрия гиалуроната ацетонитрилом в виде гиалуроновой кислоты, центрифугирование и отделение осадка, его дальнейшее растворение (раствор 1) и количественный анализ гиалуроновой кислоты.

III стадия включает анализ остальных компонентов в надосадочной жидкости (раствор 2). Количественное определение фитиновой кислоты проводили спектрофотометрическим методом с реактивом Вэйда [20, 88, 182], используя аликвоту водо-ацетонитрильного кислого раствора (раствор 2).

IV стадия – Количественное определение фитиновой кислоты в растворе 2 по содержанию общего фосфора. Первоначально проводят минерализацию окислительной смесью азотной и хлорной кислот аликвоты раствора с последующим фотометрированием комплекса молибденованадатных гетерополикислот [3, 9, 138, 140].



Качественное и количественное определение протонированной формы ксимедона определяли по ультрафиолетовые спектрам поглощения раствора 2 (максимум полосы поглощения при 308 ± 2 нм).

V стадия включает использование аликвот раствора 2 для проведения ВЭЖХ-анализов. Для количественного определения ксимедона аликвоту раствора 2 растворяли и анализировали при длине волны 309 нм, подвижная фаза – вода: ацетонитрил (79:21).

Раствор 2 используется в пробоподготовке метилпарабена для ВЭЖХ-анализа [102]. Для этого раствор 2 обрабатывали смешивали с элюентом (буфер рН 7,0 – ацетонитрил = 1:1).

4.2.2. Разработка норм качества и валидационных характеристик методики определения ксимедона в геле «Ксифит»

Аликвоту 2 мл раствора 2 (схема 4.1) использовали для проведения УФ или ВЭЖХ анализа при длине волны 309 нм, используя в качестве подвижной фазы смесь вода: ацетонитрил (79:21). На рис.4.1 и в табл. 4.2 приведён пример количественного определения ксимедона методом ВЭЖХ.

Хроматограмма ксимедона с временем удерживания представлен на рисунке 3.30, а. С использованием метода «введено-найдено» для семи точек модельных смесей была получена линейная зависимость $C = f(S \text{ пика})$, имеющая уравнение $y = (1.81635e-008)X + (0.00499206)$ с коэффициентом корреляции R^2 , равным 0,9958993 (рис. 4.1, б).

По полученному уравнению графика проводилось определение содержания ксимедона в исследуемом геле по трем измерениям площади пика (табл. 4.2).

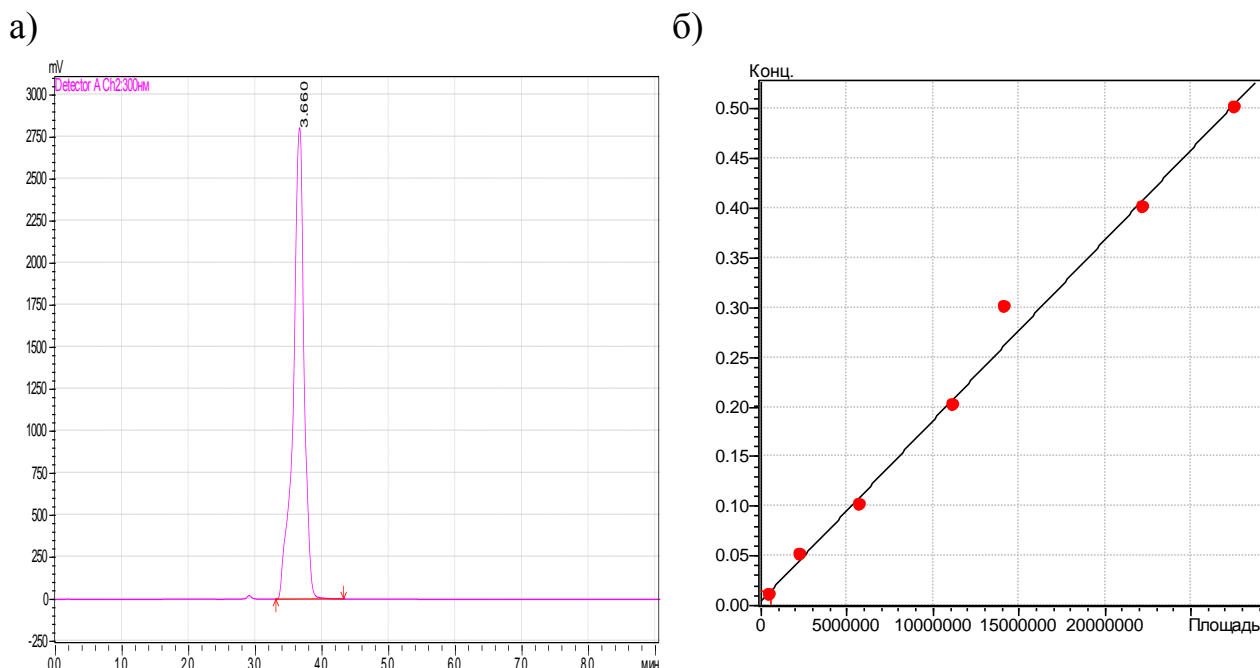


Рис. 4.1. а.) Хроматограмма ксимедона с временем удерживания; б.) ВЭЖХ-анализ модельных смесей гелей с концентрацией ксимедона в стандартных растворах: 0.01г/л, 0.05г/л, 0.1г/л, 0.2г/л, 0.3г/л, 0.4г/л, 0.5г/л.

Таблица 4.2.

Внутрилабораторные точность и прецизионность методики определения содержания ксимедона в геле

№	Масса навески, г	S пика $\times 10^8$	Содержание в исследуемом растворе, г	Содержание, %	Характеристики валидации
1	1,015	0,05258	0,1005	10,05	$\bar{x} = 10,03$; $S^2 = 0,01030$; $S = 0,10149$; $S_x = 0,058664$; $t_{\text{табл.}} (95\%, 2) = 4,30$ $\Delta \bar{x} = 0,2523$ $\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 10,03 \pm 0,2523$ $\varepsilon = 2,515$
2	1,2051	0,05187	0,0992	9,92	
3	1,0521	0,05297	0,1012	10,12	

4.2.3. Разработка норм качества и валидационных характеристик методики определения фитиновой кислоты в геле «Ксифит»

Для определения содержания фитиновой кислоты был выбран метод определения с реактивом Вэйда из-за высокой чувствительности метода и простоты приготовления реактива Вэйда.

Анализ фитиновой кислоты

В литературе описаны многочисленные методики определения фитиновой кислоты. В целом, их можно разделить на две большие группы:

1) Методики с использованием цветных реактивов, представляющих собой сложные и достаточно устойчивые комплексы железа с лигандами, такими как 1,10-фенантролин, катехолы, сульфосалициловая кислота, тиоционат [68, 76, 114, 160, 179]. Фитиновая кислота способна вытеснять железо из таких комплексов, образуя более устойчивые неокрашенные комплексы. Детектирование образования фитата железа или исходных окрашенных комплексов железа с лигандами проводят как с использованием спектрофотокolorиметрических методов анализа, так с использованием ВЭЖ-хроматографии с различными детекторами (ионный, УФ, флуоресцентный, хемоллюминесцентный).

2) Методики по определению фосфорсодержащих соединений в виде фосфатов, фосфорных эфиров (^{31}P -ЯМР, потенциометрия) и определение общего фосфора, например ванадиево-молибдатным методом [138].

Предварительными исследованиями с индикаторами (1,10-фенантролином, катехолами, сульфосалициловой кислотой, тиоционатом) показано, что для анализа растворов и гелей наиболее простым и удобным методом является спектрофотометрический анализ с реактивом Вэйда (железо сульфосалицилатный комплекс).

Результаты УФ-спектрофотометрического определения фитиновой кислоты с реактивом Вэйда представлены в табл. 4.3 и на рис. 4.2.

Таблица 4.3.

Данные УФ-спектров реактива Вэйда под влиянием фитиновой кислоты

№	конц. ФК, μM	A (среднее)	$A_0 - A_{\text{тек}}$ (среднее)
1	0	0,5478	0,0000
2	150	0,4455	0,1023
3	300	0,3923	0,1555
4	450	0,3555	0,1923
5	600	0,3093	0,2385
6	750	0,2715	0,2763
7	1000	0,1890	0,3588

A_0 – оптическая плотность раствора реагента

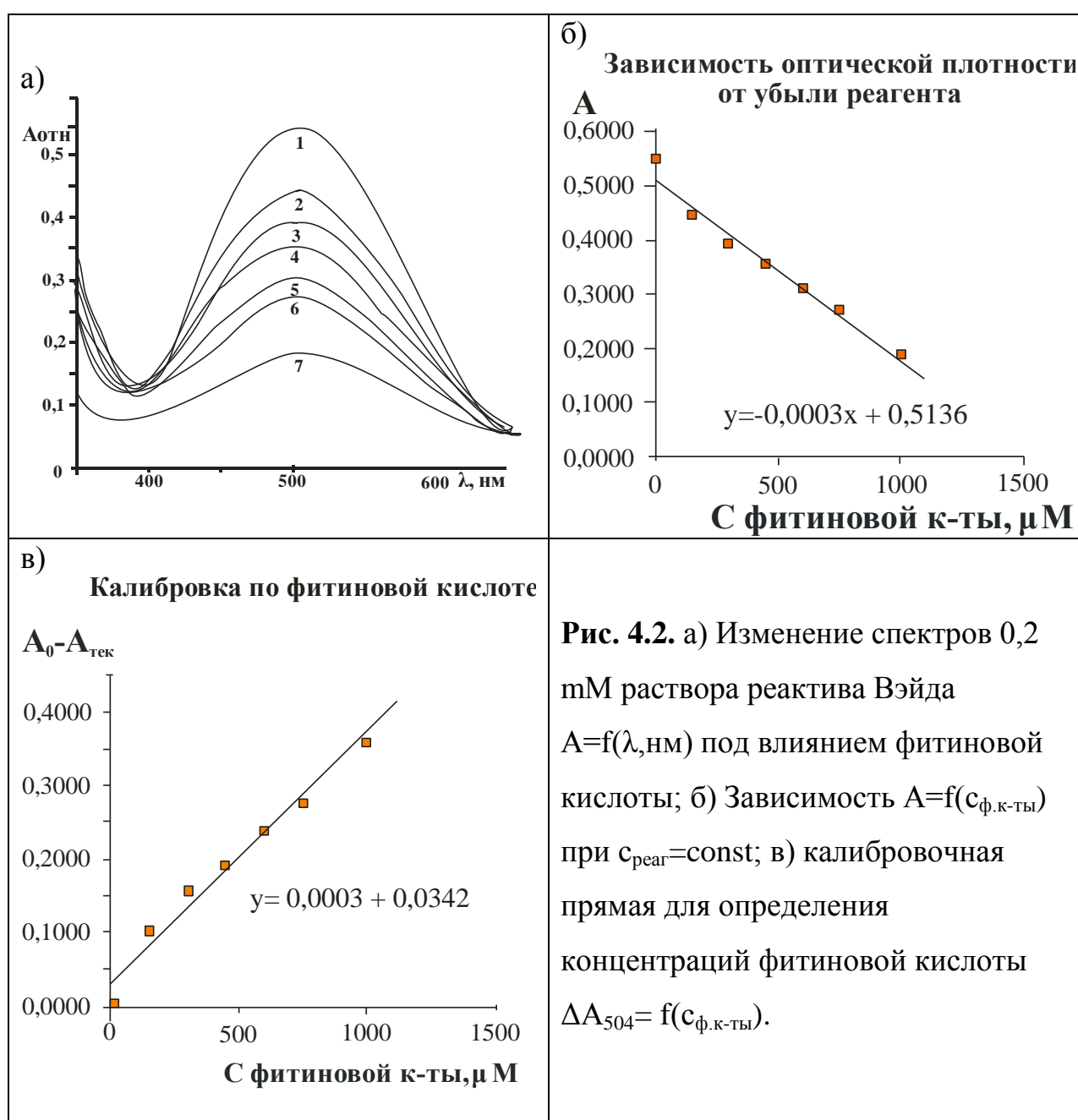


Рис. 4.2. а) Изменение спектров 0,2 mM раствора реактива Вэйда $A=f(\lambda, \text{nm})$ под влиянием фитиновой кислоты; б) Зависимость $A=f(c_{\text{ф.к-ты}})$ при $c_{\text{реаг}}=\text{const}$; в) калибровочная прямая для определения концентраций фитиновой кислоты $\Delta A_{504} = f(c_{\text{ф.к-ты}})$.

С использованием метода «введено-найдено» для трех точек модельных смесей была получена линейная зависимость $A = f(c)$ для $\lambda_{\max} = 503$ нм, имеющая уравнение $y = -0,0157x + 0,3908$ с коэффициентом корреляции R^2 , равным 0,9935 (рис. 4.3).

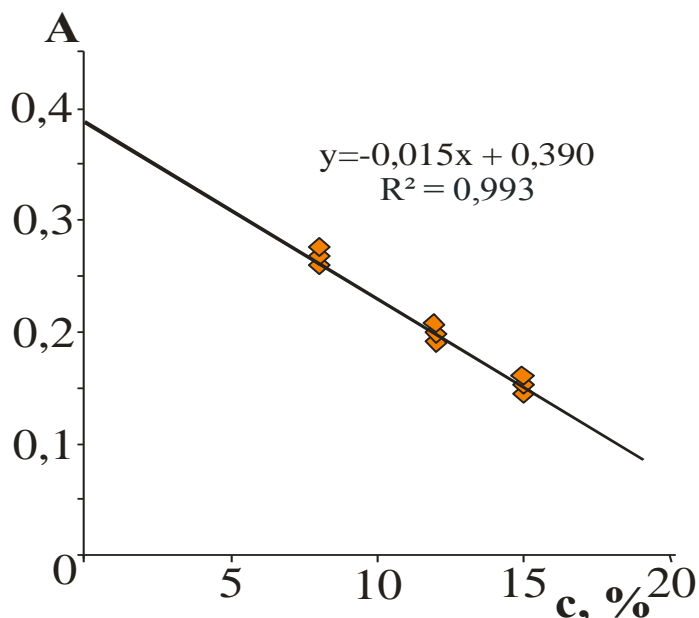


Рис. 4.3. Спектрофотометрический анализ модельных смесей гелей «Ксифит» с реактивом Вэйда: 1 – масс. 8%; 2 – масс. 12%; 3 – масс. 15% фитиновой кислоты.

По полученному уравнению графика проводилось определение содержания фитиновой кислоты по трем измерениям оптической плотности (табл. 4.4).

Таблица 4.4.

Внутрилабораторные точность и прецизионность методики определения содержания фитиновой кислоты в геле

№	A, отн. ед.	Содержание, %	Характеристики валидации
1	0,198	12,28	$\bar{x} = 12,51$; $S^2 = 0,06645$; $S = 0,2578$; $S_x = 0,14902$; $t_{\text{табл.}} (95\%, 2) = 4,30$ $\Delta \bar{x} = 0,64077$ $\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 12,51 \pm 0,641$ $\varepsilon = 5,1221$
2	0,190	12,79	
3	0,195	12,47	

4.2.4. Разработка норм качества и валидационных характеристик методики определения натрия гиалуроната в геле «Ксифит»

Анализ натрия гиалуроната основан на кислотной деструкции гиалуроновой кислоты до D-глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Методика спектрофотометрического определения при $\lambda_{\text{max}}=530$ нм основана на цветной реакции с продуктом окисления D-глюкуроновой кислоты до 5-карбоксихурфуrolа и цветной реакции последнего с карбазолом с получением интенсивно-окрашенный фиолетовый комплекса (схема 4.2).

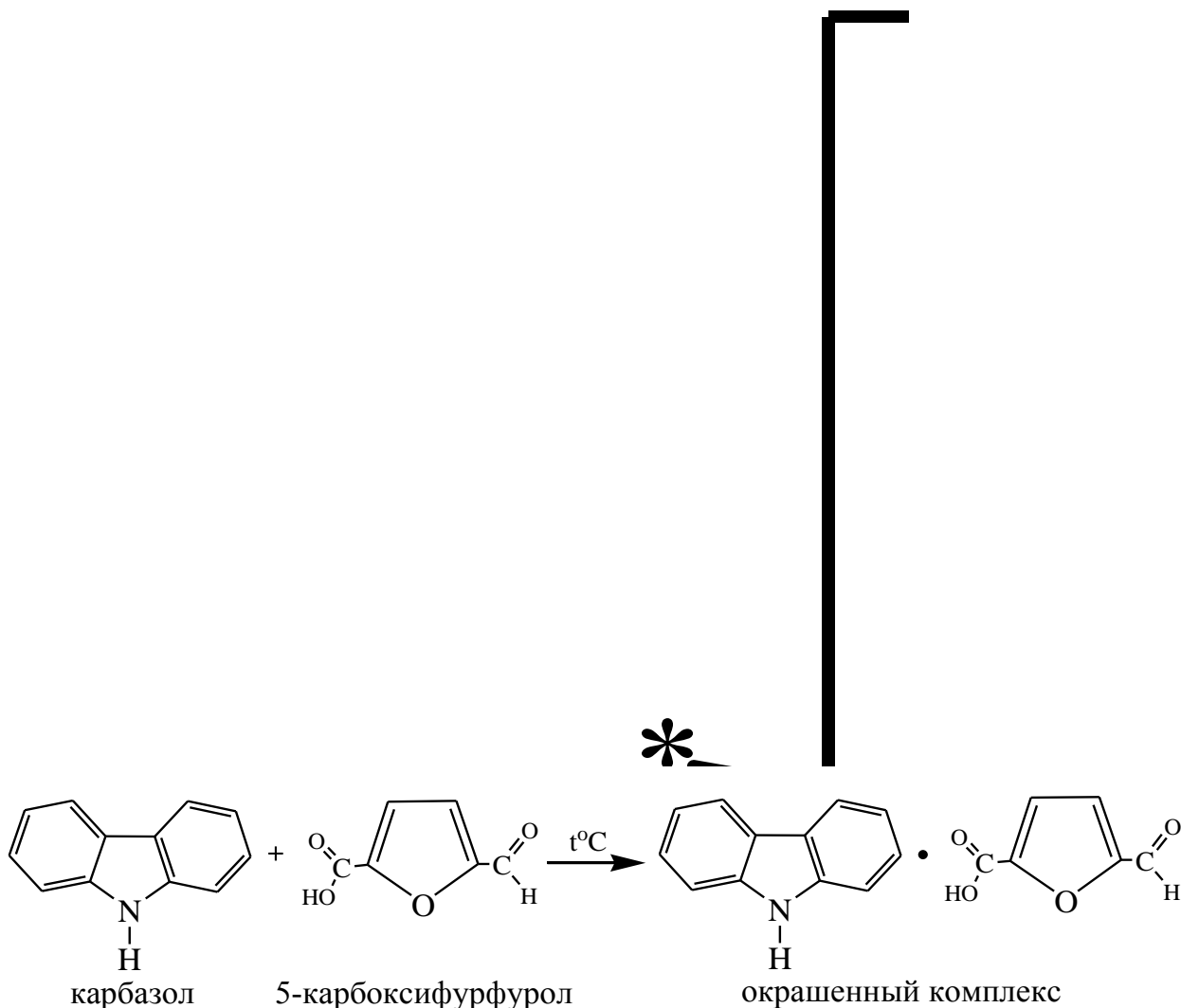
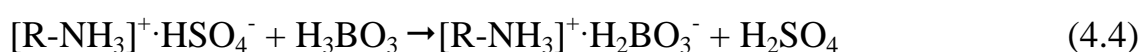


Схема 4.2. Гидролиз и окисление натрия гиалуроната и образование окрашенного комплекса с карбазолом.

К 3 г геля прибавляли 1-2 мл соляной кислоты концентрированной и 15 мл ацетонитрила. Образующийся осадок после центрифугирования использовали для анализа натрия гиалуроната. Для этого осадок разбавляли в 100 мл дистиллированной воды для получения раствора 1 (схема 4.1). К 2 мл раствора 1 гиалуроновой кислоты помещали в пробирку с притёртой пробкой, прибавляли 5 мл натрия тетрабората в сернокислой среде для связывания продуктов окисления N-ацетилглюкозамина ($[R-NH_3^+][HSO_4^-]$) образующейся борной кислотой:



Все дальнейшие операции были проведены в соответствии с методикой, описанной в главе 2. На заключительной стадии добавляли карбазол, взаимодействующий с 5-карбоксифурфуролом с образованием окрашенного комплекса ($\lambda_{max} = 530$ нм) (схема 4.2).

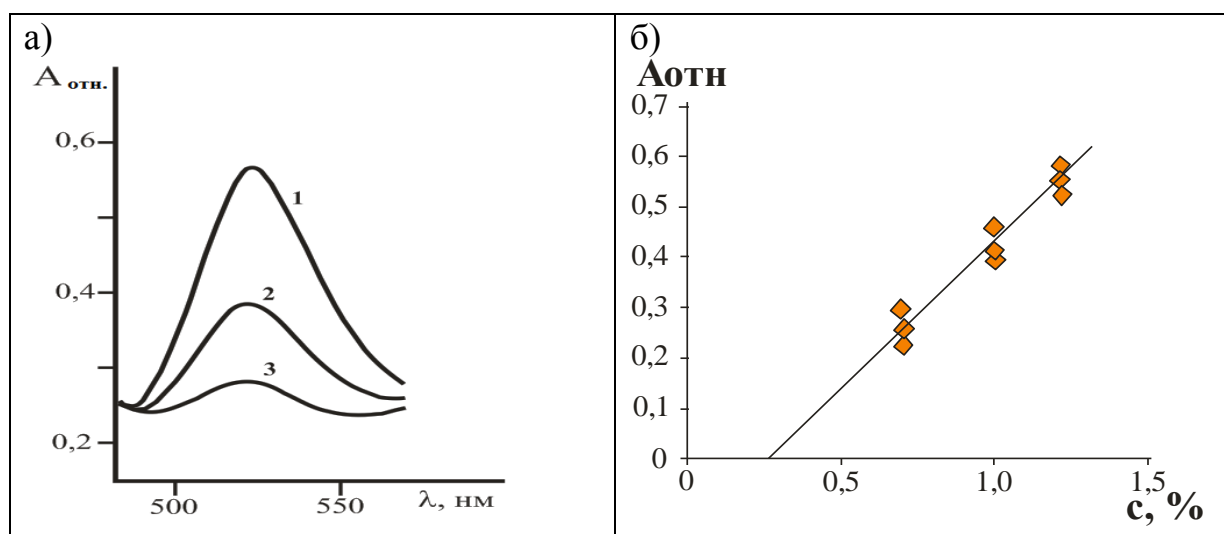


Рис. 4.4. а) Вид спектральных кривых $A = f(\lambda)$ в области 480-580 нм; б) Спектрофотометрический анализ модельных смесей гелей «Ксифит» с карбазолом: 1 – масс. 0,7%; 2 – масс. 1,0%; 3 – масс. 1,2% натрия гиалуроната.

Вид спектральных кривых $A = f(\lambda)$ в области 480-580 нм представлен на рисунке 4.4а. С использованием метода «введено-найдено» для трех точек модельных смесей была получена линейная зависимость $A = f(c)$ для $\lambda_{max} =$

530 нм, имеющая уравнение $y = 0,5789x - 0,1463$ с коэффициентом корреляции R^2 , равным 0,9098.

Определение содержания гиалуроната натрия проводилось после трёх измерений оптической плотности по полученному уравнению графика (рис. 4.4., табл. 4.5) λ , нм

Таблица 4.5.

Внутрилабораторные точность и прецизионность методики определения содержания натрия гиалуроната в геле

№	Масса навески, г	A, отн. ед.	Содержание, %
1	3,001	0,3626	$\bar{x} = 0,8940$; $S^2 = 0,000181$; $S = 0,01345$; $S_x = 0,007775$;
2	2,985	0,3736	
3	2,989	0,3776	$t_{\text{табл.}} (95\%, 2) = 4,30$ $\Delta \bar{x} = 0,03343$ $\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 0,8940 \pm 0,0334$ $\varepsilon = 3,7394$

4.2.5. Разработка норм качества и валидационных характеристик методик определения нипагина в геле «Ксифит»

Раствор 2 (схема 4.1) используется в пробоподготовке метилпарабена для ВЭЖХ-анализа. Для этого 2 мл раствор 2 обрабатывали ацетонитрилом и смешивали с элюентом (буфер pH 7,0 – ацетонитрил = 1:1).

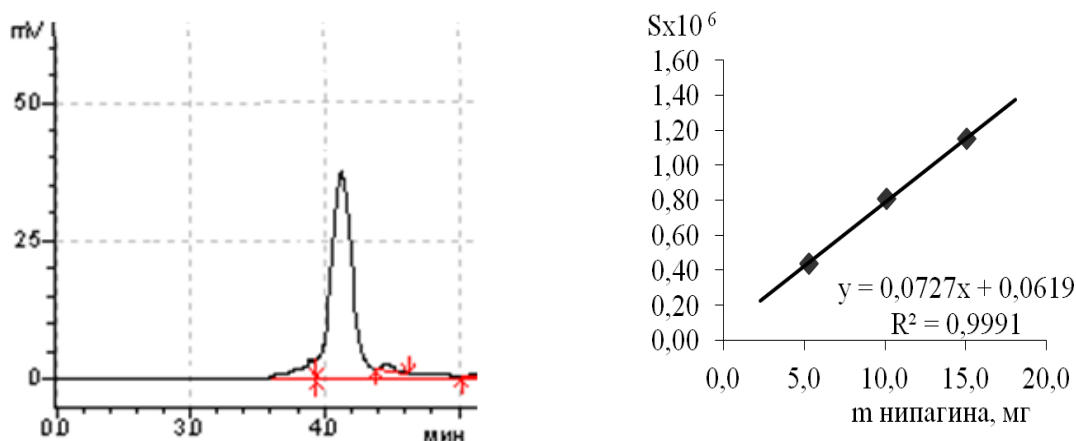


Рисунок 4.5. Хроматографический анализ метилпарабена в геле: а) ВЭЖ-хроматограмма; б) калибровочная прямая метилпарабена по методу «введено-найдено»

4.2.6. Установление подлинности трисамина в геле «Ксифит»

Установление подлинности трисамина проводили методом ^{13}C -ЯМР спектроскопии, используя раствор 2. Аликвота 10 мл подвергалась высушиванию под вакуумом при температуре 30-50°C. Сухой остаток растворяли в дейтерированной воде. Сравнивали с ^{13}C -ЯМР спектрами стандарта трис-оксиметиламинометана, его гидрохлоридной формы и исследуемого образца (рис. 3.13). Спектр ТА гидрохлорида и комплекса фитиновой кислоты с ТА совпадали.

4.2.7. Спецификация на новый противоожоговый гель «Ксифит»

В результате проведенных исследований был разработан проект фармакопейной статьи (приложение 1) на противоожоговый гель «Ксифит» с комплексом $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ и Кси, спецификация на который, а также статистические данные результатов по каждому разделу представлены ниже.

СПЕЦИФИКАЦИЯ

Противоожоговый гель «Ксифит».

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный	Прозрачный гель оранжевого цвета без включений.
Подлинность	1. Качественные химические реакции на фосфор (ГФ XI, вып.1, с. 159). 2. Спектрофотометрия (натрия гиалуронат)	1. Препарат должен давать качественные реакции на фосфор. 2. Электронный спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения натрия гиалуроната, в области 450-

	<p>3. Спектрофотометрия (анион фитиновой кислоты)</p> <p>4. ВЭЖХ (метилпарабен)</p> <p>5. ВЭЖХ (протонированный ксимедон)</p>	<p>600 нм должен соответствовать электронному спектру поглощения градуировочных растворов натрия гиалуроната, измеренных в этих же условиях.</p> <p>3 Электронный спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения фитиновой кислоты, в области 450-600 нм должен соответствовать электронному спектру поглощения раствора СО фитиновой кислоты, измеренного в этих же условиях.</p> <p>4. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме градуировочных растворов метилпарабена</p> <p>5. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания пика на</p>
--	---	--

	6. ^{13}C -ЯМР (трисамин)	хроматограмме градуировочных растворов ксимедона. 6. Реперная полоса (63±1м.д.) должна соответствовать положению для стандартного раствора трисамина.
рН среды	Потенциометрически, ГФ XII, стр. 89	От 6,4 до 6,8
Масса содержимого	НД	От 47,5 до 52,5 мл
Количественное определение: протонированный ксимедон Анион фитиновой кислоты Натрия гиалуронат Метилпарабен	ВЭЖХ Спектрофотометрия Спектрофотометрия ВЭЖХ	от 9,5 до 10,5 (на 100 г геля) от 11,74 до 12,36 г (на 100 г геля) от 0,837 до 0,963 г (на 100 г геля) от 0,064 до 0,096 г (на 100 г геля)
Микробиологическая чистота	ГФ XII, изд. №1, с. 160	Категория 2
Упаковка	НД	По 50 г в алюминиевые тубы.
Маркировка	НД	В соответствии с ФС
Транспортировка	В соответствии с РД 9301-006-05749470-93	
Хранение	НД	В прохладном месте, при температуре от 0 до +10 ⁰ С.
Срок годности	3 года	

Таблица 4.6.

Экспериментальные данные количественного анализа компонентов геля

№ анализа	Количественное определение		
	Протонированный ксимедон	Анион фитиновой кислоты	Гиалуронат натрия
1	10,05	12,28	0,879
2	9,92	12,79	0,898
3	10,12	12,47	0,905

Таблица 4.7.

Количественное определение протонированного ксимедона в составе комплекса фитиновой кислоты и ксимедона

№ п/п	Навеска, г	Результат анализа	Статистические данные						
			\bar{x}	S^2	S	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$E_{отн}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$
1	1,0150	10,05	10,03	$1,03 \cdot 10^{-2}$	$1,01 \cdot 10^{-1}$	$5,87 \cdot 10^{-2}$	0,25	2,52	$10,03 \pm 0,25$
2	1,2051	9,92							
3	1,0521	10,12							

Таблица 4.8.

Количественное определение аниона фитиновой кислоты в составе комплекса фитиновой кислоты и ксимедона

№ п/п	Навеска, г	Результат анализа	Статистические данные						
			\bar{x}	S^2	S	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$E_{отн}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$
1	25,475	12,28	12,51	$6,65 \cdot 10^{-2}$	$2,58 \cdot 10^{-1}$	$1,49 \cdot 10^{-1}$	0,64	5,12	$12,51 \pm 0,64$
2	25,038	12,79							
3	25,195	12,47							

Таблица 4.9.

Количественное определение гиалуроната натрия

№ п/п	Навеска, г	Результат анализа	Статистические данные						
			\bar{x}	S^2	S	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$E_{отн}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$
1	3,320	0,879	$8,94 \cdot 10^{-1}$	$1,81 \cdot 10^{-4}$	$1,35 \cdot 10^{-2}$	$7,78 \cdot 10^{-3}$	0,033	3,74	$0,894 \pm 0,0334$
2	3,254	0,898							
3	3,106	0,905							

4.3. Репаративные свойства геля на основе комплекса фитиновой кислоты и ксимедона

Исследование эффективности действия гидрофильных гелей с фитиновой кислотой в эксперименте на крысах показало, что наружное применение гелей на основе фитиновой кислоты при лечении ожоговой раны способствует быстрой эпителизации. Эпителизацию оценивали по относительному уменьшению площади ожоговой раны.

В целом, во всех группах животных на 10-й день лечения почти или полностью исчезли струпы, а раны эпителизовались. Площадь ожоговой раны резко снижалась.

Лечение гелем только с фитиновой кислотой (состав 4), хотя и вызывало отторжение струпных корок уже на третьи сутки, но регенерация тканей в ране не происходила. Использование гидрофильных гелей комплекса фитиновой кислоты с ксимедоном (состав 3) показывало наилучшее заживление раны, как по скорости отторжения струпа, так и по степени эпителизации.

Таблица 4.10.

Динамика заживления ожоговой раны в ходе лечения гидрофильными гелями на основе фитиновой кислоты.

Время лечения Группы	Площадь воспаления					
	исходная площадь ожога	3 сутки	5 сутки	6 сутки	7 сутки	10 сутки
Ксимедон (состав 5)	235 мм ²	180	170	165	110	70
Фитиновая кислота (состав 4)		220	210	205	190	170
Комплекс фитиновой кислоты с ксимедоном (состав 3)		150	135	115	70	40
Препарат сравнения Декспантенол гель для наружного применения 4%.		200	185	170	110	80

Влияние использования гелей с комплексом фитиновой кислоты и ксимедона на процессы липопероксидации *in vivo*.

Исследованиями *in vivo* на плазме крови крыс доказано, что эффективность действия новых фармацевтических композиций обусловлена в том числе высоким значением общей антиоксидантной активности $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ и снижением продуктов липопероксидации в плазме крови на примере малонового диальдегида.

Установлено, что под действием геля с фитиновой кислотой (составы 4 и 5, группы 4 и 5), уровень липопероксидации (рис. 4.6 а) не превышает значения контроля, а общая антиоксидантная активность (АОА) возрастает (рис. 4.6 б).

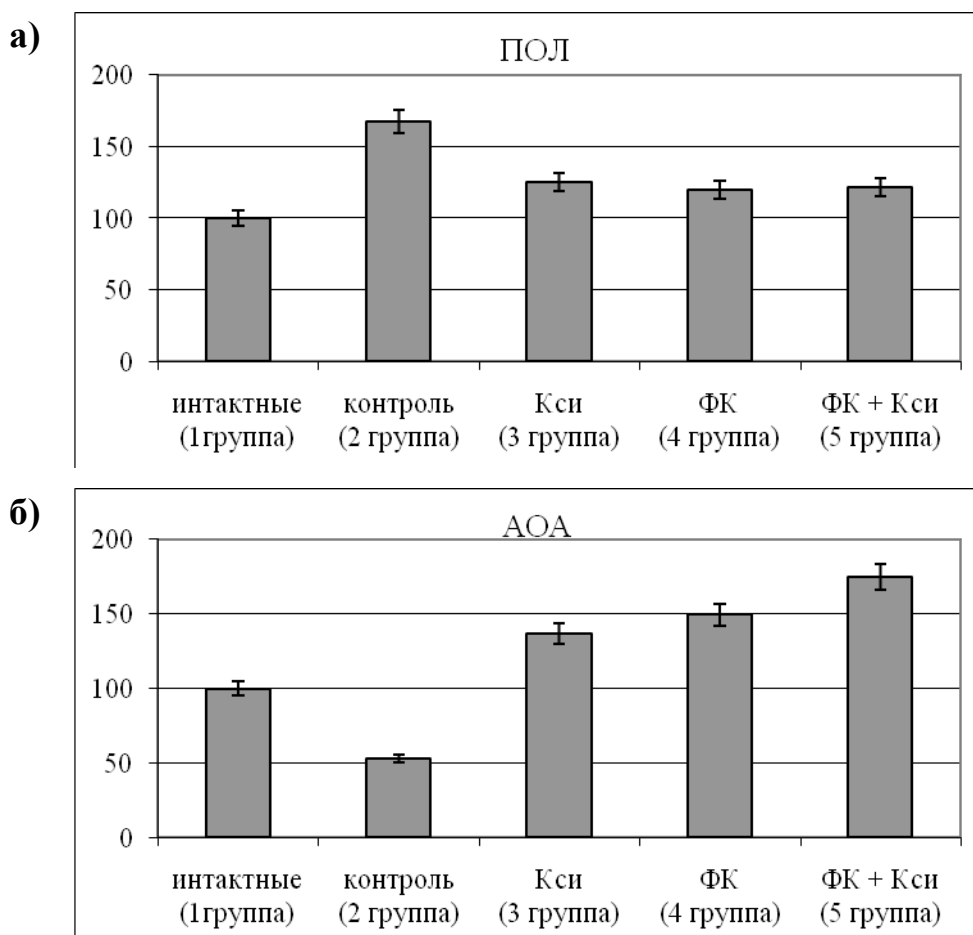


Рис. 4.6. Интенсивность перекисного окисления липидов (а) и общая антиоксидантная активность (б), в плазме крови крыс под действием исследуемых гелей.

Уровень малонового диальдегида в плазме крови (МДАпл) при воздействии гелей с фитиновой кислотой снижается (рис. 4.7). Наилучший результат получен при использовании комбинированных гелей, содержащих ксимедон и фитиновую кислоту, что отражает специфическое влияние их комплекса.

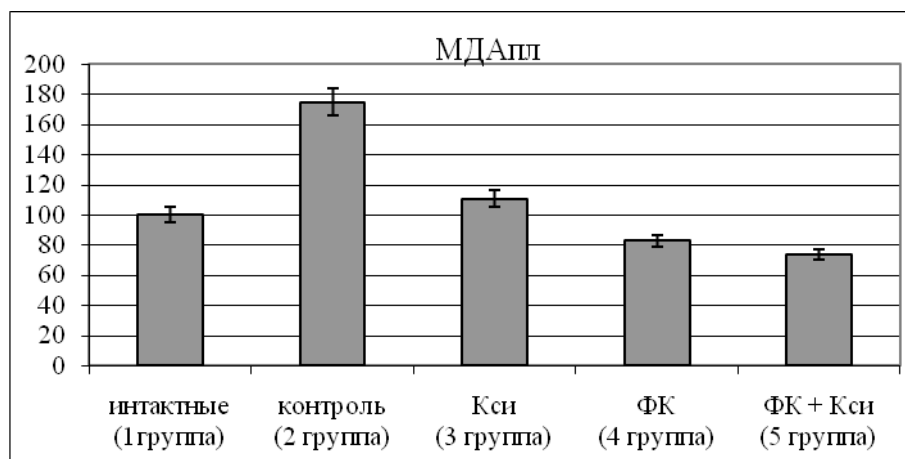


Рис. 4.7. Уровень малонового диальдегида в плазме крови крыс под действием исследуемых гелей.

Таким образом, в эксперименте на крысах доказаны высокие репаратные свойства разработанных гелей при лечении ожоговых ран. Предложенный состав, показывающий высокую осмотическую активность, показан на первой стадии раневого процесса.

Исследованиями на плазме крови крыс доказано, что эффективность действия новых фармацевтических композиций обусловлена высоким значением общей антиоксидантной активности фитиновой кислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

В результате проведённых нами исследований, установлена роль комплексов фитиновой кислоты и биогенных аминов в повышении антиоксидантного статуса организма человека. Показано, что в качестве биогенных аминов наиболее перспективны лекарственные вещества основного характера – ксимедон[®], глюкозамин, трисамин. Приведённые ниже выводы позволяют конкретно оценить полученные в диссертационной работе данные, которые могут быть использованы при разработке новых лекарственных средств.

Выводы

1. Впервые получены и изучены физико-химические свойства комплексов фитиновой кислоты и ксимедона в водной среде (УФ-спектроскопия, потенциометрическое титрование) и в твёрдом состоянии (ИК-¹³C-¹H-³¹P- спектроскопия). Стехиометрия комплексов (от 5:1 до 10:1) зависит от условий приготовления. Катионоидной частью комплексов является протонированный ксимедон по атому кислорода карбонильной группы, характеризующейся $pK_{\text{катион}}=3,25$; при этом инозитольный цикл аниона фитиновой кислоты остаётся неизменным (эксперименты с реактивом Вэйда, ³¹P-ЯМР).

2. Впервые получены солевые комплексы глюкозамина фитатов состава $\text{InsP}_6\text{H}_7 \cdot 5\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_5\text{N}$ (элементный анализ по C, N, H, P), образующихся за счёт водородного связывания и электростатического взаимодействия (ИК-¹H- и ¹³C-³¹P- ЯМР спектроскопия и потенциометрическое титрование).

3. Разработаны методы идентификации и количественного определения комплексов фитиновой кислоты с ксимедоном. Содержание протонированной формы ксимедона определяли УФ-спектрометрически и методом ОФ-ВЭЖ хроматографии, содержание гексафосфат инозитольного фрагмента – спектрометрически с реактивом Вэйда и по анализу на общий фосфор.

4. Доказана высокая антиоксидантная активность комплексов фитиновой кислоты с ксимедоном и глюкозамином в исследованиях *in vitro* на плазме крови человека по отношению к процессам липопероксидации и по

положительному влиянию на активность супероксиддисмутазы. Установлено, что в водной среде ксимедонафитаты проявляют более сильное антиоксидантное действие по сравнению с глюкозамина фитатами.

5. Разработаны и исследованы составы новых противоожоговых гелей ксимедонафитата на гидрофильной основе натрия гиалуроната, включающего в качестве действующих веществ ксимедон и фитиновую кислоту, а также трисамин – как компонент, регулирующий рН. Показана высокая осмотическая активность гелей. Эффективность ранозаживляющего действия гелей доказана в эксперименте на крысах при моделировании термического ожога.

6. Разработаны методики установления подлинности и количественного определения активных и вспомогательных компонентов в гидрофильном геле «Ксифит». Разработаны нормы качества и спецификация на предложенный состав.

В соответствии с изложенными выводами можно дать следующие практические рекомендации.

Практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы:

Разработанный проект фармакопейной статьи на новый противоожоговый гель «Ксифит» может быть внедрён в производственный процесс фармацевтических предприятий. Разработанные методики анализа компонентов противоожогового гидрофильного геля комплексов фитиновой кислоты и ксимедона могут быть внедрены в лабораторные практикумы, учебный процесс и научно-исследовательскую работу ВУЗов.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в получении комплексов фитиновой кислоты с различными аминами с широким спектром фармакологического воздействия и исследовании их медико-биологических свойств, получение новых лекарственных форм на основе предложенных комплексов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Актуальные вопросы диагностики и лечения / Под. ред. Г.А. Измайлова и др. – Казань : Изд-во "Матбугат йорты", 1998. – 184 с.
2. Актуальные вопросы диагностики и лечения / Под. ред. Г.А. Измайлова и др. – Казань : Изд-во "Матбугат йорты", 1997. – 146 с.
3. Алимарин И.П., Фрид Б.И. Количественный микрохимический анализ минералов и руд. Практическое руководство. – М.: Государственное научно–техническое издательство химической литературы, 1961. – 401 с.
4. Бесчастнов В.В., Измайлов С.Г., Ботяков А.А., Жаринов А.Ю., Пантелеев Д.А., Мельникова Н.Б. Антиоксидантная активность пириимидиновых производных при местном лечении гнойных ран мягких тканей (в эксперименте) // Современные технологии в медицине. 2011. № 3, С. 21-26.
5. Владимиров Ю.А., Азимова О.А., Деев А.И., Козлов А.В., Осипов А.Н., Рощупкин Д.И. Свободные радикалы в живых системах. Итоги науки и техники // Биофизика. 1991. Т.29. С. 250-258.
6. Власов А.П., Тарасова Т.В., Судакова Г.И. и др. Влияние антиоксидантов на эндотоксикоз при экспериментальном перитоните // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2000. №6. С. 58-61.
7. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции –М.: Мир, 1997. – 624с.
8. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии в 3-х т. Том 2: пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта и др. – М.: Мир, 1983. – 472 с.
9. Государственная Фармакопея Российской Федерации XII. М.: Издательство «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2010. Ч. 2. – 502 с.
10. Даутова Г.С., Косых В.А., Репин В.С. и др. Влияние ксимедона на метаболизм холестерина и экспериментальный атеросклероз у кроликов // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1995. №1. С. 25-29.

11. Зенков Н.К. Окислительный стресс. Биохимический и физиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова.- М.: МАИК. Наука/Интерпериолика, 2001. – 343 с.
12. Иванов С. Д. Железо и рак: роль ионов железа в процессе канцерогенеза и при лучевой терапии опухоленосителей // Успехи современной биологии. 2013. Т. 133. № 5. С. 481-494.
13. Измайлов Г.А., Эвранова Г.Б., Измайлов С.Г. и др. Использование ксимедона в лечении трофических язв нижних конечностей // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 1993. №7(12). С. 43-46.
14. Измайлов С.Г. Ксимедон в клинической практике / Измайлов С.Г., Измайлов Г.А., Аверьянов М.Ю., Резник В.С., – Н. Новгород: НГМА, 2001. – 192 с.
15. Измайлов С.Г., Горбунов С.М., Измайлов Г.А., Заиконникова И.В., Резник В.С., Абдрахманова Н.Г., Пашкуров Н.Г., Кедрин М.Ю., Герасимова М.Х., Гараев В.Н., Измайлов А.Г., Подушкина И.В., Эвранова Г.Б., Муслинкин А.А. Доклиническое исследование ксимедона // Антибиотики и химиотерапия. 1999. №8. С. 12-17.
16. Кельнер Р. Аналитическая химия. Проблемы и подходы. Том 2. / пер. с англ. – М.: Мир, 2004 – 728 с.
17. Кочнев О.С., Измайлов С.Г. Применение ксимедона для стимуляции заживления и профилактики нагноений послеоперационных ран // Хирургия. 1991. №5. С. 27-30.
18. Ксимедон / Под ред. Г.А.Измайлова и др. Казань: изд-во ИОФХ им. А.Е.Арбузова КФАН СССР., 1986.- 146 с.
19. Марченко З. Фотометрическое определение элементов: пер. с польск. / З. Марченко; под ред. Ю.А. Золотова. – М.: Мир, 1971. – 348 с.
20. Машковский М.Д. Лекарственные средства / Пособие для врачей. 15–е издание. Справочник. М.: Новая Волна. 2009. 1164 с.
21. Мельникова Н.Б., Пантелеев Д.А., Жильцова О.Е., Волков А.А., Гуленова М.В., Саликова Т.В. Взаимодействие редко-сшитой полиакриловой

кислоты и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы с ксимедоном (1-(β-оксиэтил)-4,6-диметил-1,2-дигидро-2-оксопиримидином) в водной среде // Вестник Нижегородского Университета им. Н.И. Лобачевского. Серия Химия. 2011. №5. С. 91-96.

22. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков, И.А.Бондарь, Н.Ф. Круговых, В.А. Труфакин. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.

23. Метелица Д.Н. Активация кислорода ферментными системами / Д.Н. Метелица. – М., 1982. – 450с.

24. Нейланд О.Я. Органическая химия / О.Я. Нейланд. – М.: Высшая школа, 1990. – 751 с.

25. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А. Овчинников. — М.: Просвещение, 1987. – 815с.

26. Отто М. Современные методы аналитической химии: пер. с нем. / М. Отто; под ред. А.В. Гармаша. – М.: Техносфера, 2003. Т. 1. – 416 с.

27. Пантелеев Д.А. Физико-химические и фармакологические свойства ксимедона в новых гидрофильных гелях и мазях: Автореф. дис. ... канд. хим. наук: 14.04.02; Место защиты: ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»]. – Казань, 2012. – 24 с.

28. Пат. SU 1806350 Российская Федерация, МПК7 G01N21/78. Способ количественного определения трисамина / Зоря Б.П., . Петренко В.В., Бирюк И.А., Афанасьев В.В., заявитель и патентообладатель Запорожский Медицинский Институт. – № 491.1014/04. заявл. 18.02.91, опубл. 30.03.93, Бюл. N. 12 (71).- 3 с. : ил.

29. Рагинов И.С., Челышев И.А. Сенсорные нейроны и шванновские клетки и воздействие медикаментозной стимуляции регенерации нервов // Морфология. 2000. №6. С. 36-40.

30. Радион Е.В. Физико-химические методы анализа. Лабораторный практикум: учебн.-метод. пособие для студентов химико-технологических

специальностей / Е. В. Радион [и др.]; под ред. Е. В. Радион. – Минск: БГТУ, 2010. – 110 с.

31. РеЛеС. Реестр лекарственных средств. URL: <http://reles.ru/> (дата обращения: 15.05.2014).

32. Рудник О.А. Фармакологические свойства некоторых производных инозитгексафосфорной кислоты: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.25; [Место защиты: «Белорусский государственный медицинский университет»]. – Минск, 2002. – 23 с.

33. Свердлова О. В.. Электронные спектры в органической химии. – Л.: Химия, 1985. 248 с.

34. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопросы медицинской химии. 1999. № 3. С. 263-272.

35. Слабнов Ю.Д., Визель А.А., Черепнев Г.В. и др. Применение системного иммуномодулятора ксимедона при деструктивном легочном туберкулезе // Проблемы туберкулеза. 2000. №3. С. 28-32.

36. Слабнов Ю.Д., Гилев А.В., Черепнев Г.В. Профилактическое действие ксимедоновой мази при острых лучевых поражениях кожи после дистанционной гамма-терапии у больных злокачественными опухолями головы и шеи // Казанский медицинский журнал. 1996. № 3. С. 182-184.

37. Соколов Р.А., Мельникова Н.Б., Яшнова О.К., Стручков А.А., Погодин И.Е. Возможности ИК-спектроскопии для контроля фармакокинетики ингредиентов гелевой композиции «Левоксим», содержащей ксимедон, при лечении ожоговых ран. // OZON O3 TERAPIA (Озон, активные формы кислорода и методы интенсивной терапии в медицине). 2009. №3(8). С. 168-171.

38. Терещенко В.Ю., Измайлов Г.А., Измайлов С.Г., Габбасов Р.Н. Ксимедон как неспецифический стимулятор процессов остеогенеза. В кн.: Современные методы диагностики и лечения. Казань; 1995; с. 359-361.

39. Терещенко В.Ю., Малышев К.В. Использование ксимедона в сочетании с лазерной терапией в комплексном лечении хронического остеомиелита. В кн.: Новые методы диагностики и лечения. Ч.2. Казань; 1996; 77-78.

40. Труфанов О. Фитаза в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы / Труфанов О. – Киев: ПолиграфИнко, 2011. – 112 с.

41. Тюрников Ю.И., Евтеев А.А. Классификация методов активной хирургической подготовки глубоких ожогов к пластическому закрытию в системе раннего хирургического лечения обожжённых // «Комбустиология»: Научно-практический журнал. 2000. №4.

42. ФСП ЗАО «Интелфарм» 42-0037-4764-03 ксимедон.

43. Химик. Энциклопедия. URL: <http://www.xumuk.ru/encyklopedia/> (дата обращения 19.06.14).

44. Химикатус. Электронный справочник. URL: <http://www.himikatus.ru> (дата обращения 19.06.14).

45. Цибулькин А.П., Терещенко В.Ю., Слабнов Ю.Д., Хорькова М.А. Радиопротекторное средство. А.с. 1817324. 1992.

46. Черепнев Г.В., Слабнов Ю.Д., Цибулькин А.П. и др. Ксимедон восстанавливает Т-клеточный иммунный ответ, ингибированный гамма-излучением *in vivo*: взаимоотношения с Ca^{2+} -АТФазой и ДНК-релаксирующей активностью // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999. №1. С. 66-70.

47. Черепнев Г.В., Терещенко В.Ю., Малышев К.В. и др. Иммуномодулятор ксимедон уменьшает уровень индуцированных повреждений ДНК в костном мозге и клетках периферической крови: возможности иммуногенетической коррекции // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1999. №2. С. 31-35.

48. ЯМР спектр глюкозамина гидрохлорида. URL: http://mncd.nmrham.wisc.edu/expnrmr/expnrmr_00137.html (дата обращения: 13.03.2014).

49. Abdelaziz S., El-Saad A., Hamada M.M. Phytic acid exposure alters aflatoxin B1-induced reproductive and oxidative toxicity in albino rats (*Rattus norvegicus*) // *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2009. №6 (3). P. 331–341.
50. Adam W., Braun M., Griesbeck A., Lucchini V., Staab E., Will B. Photooxygenation of olefins in the presence of titanium (IV) catalyst: a convenient “one-pot” synthesis of epoxy alcohols // *Journal American Chemical Society.* 1989. № 111. P. 203-211.
51. Ahn H.-J., Kim J.-H., Jo C. et al. Comparison of irradiated phytic acid and other antioxidants for antioxidant activity // *Food Chemistry.* 2004. №88. P. 173–178.
52. Alderman L.E., Morgan W.T.J. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine // *Biochem J.* 1933. №27(6). P. 1824–1828.
53. Amaro R., Escalona A., Murillo M. HPLC with inductively coupled plasma optical emission spectrometric detection for the analysis of inositol phosphates // *Journal of Chromatographic Science.* 2004. Vol. 42. P. 491-491.
54. Aust S.D., Chignell C.F., Bray T.M., Kalyanaraman B., Mason R.P. Free radicals in toxicology // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1993. Vol.120. №2. P. 168-178.
55. Barker C. J., Berggren P. Inositol hexakisphosphate and beta-cell stimulus secretion coupling. // *Anticancer Research.* 1999. №19. P. 3737–3742.
56. Berlett B.S., Chock P.B., Yim M.B., Stadtman E.R. Manganese(II) catalyzes the bicarbonate-dependent oxidation of amino acids by hydrogen peroxide and the amino acid-facilitated dismutation of peroxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. Vol.87. №1. P. 389-393.
57. Biswas S., Maity I.B., Chakrabarti S., Biswas B.B. Purification and characterization of myo-inositol hexakisphosphate-adenosine di-phosphate phosphotransferase from *Phaseolus aureus* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1978. №185. P. 557-566.

58. Bretti C., Cigala R.M., Stefano C.D., Lando G., Sammartano S. Interaction of phytate with Ag^+ , CH_3Hg^+ , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , and VO^{2+} : Stability constants and sequestering ability // *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2012. №57. P. 2838–2847.
59. Brown E.C., Heit M.L., Ryan D.E. Phytic acid: an analytical investigation // *Canadian Journal of Chemistry*. 1961. №39(6). P. 1290-1297.
60. Brune M., Rossander-Hulthen L., Hallberg L., Gleerup A., Sandberg A.S. Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fibre, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *Journal of Nutrition*. 1992. №122. P. 442–449.
61. Butler R., Morris A.D., Belch J.J., Hill A., Struthers A.D. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension // *Hypertension*. 2000. Vol. 35. №3. P. 746-751.
62. Canan C., Delarozza F., Casagrande R., Baracat M.M., Shimokomaki M., Ida E.I. Antioxidant capacity of phytic acid purified from rice bran // *Acta Scientiarum. Technology*. 2012. Vol.34, № 4. P. 457-463.
63. Carli L.D., Schnitzler E. Equilibrium, thermoanalytical and spectroscopic studies to characterize phytic acid complexes with Mn(II) and Co(II) // *J. Braz. Chem. Soc*. 2009. Vol. 20. №8, P. 1515-1522.
64. Chen Q.-Ch. Determination of phytic acid and inositol pentakisphosphates in foods by high-performance ion chromatography // *J. Agric. Food Chem*. 2004. №52(15). P. 4604-4613.
65. Cheryan M. Phytic acid interactions in food systems. *CRC Critical Reviews // Food Science and Nutrition*. 1980. №13. P. 297-314.
66. Cheryan M., Anderson F.W., Grynspan F. Magnesium-phytate complexes: effect of pH and molar ratio on solubility characteristics // *Cereal Chem*. 1983. №60(3). P. 235-237.
67. Cigala R.M., Crea F., Stefano C.D., Lando G., Milea D., Sammartano S. Electrochemical study on the stability of phytate complexes with Cu^{2+} , Pb^{2+} ,

Zn²⁺ and Ni²⁺: A comparison of different techniques // J. Chem. Eng. Data. 2010. №55. P. 4757–4767.

68. Clemons V.M. Evaluation of methods for reducing phytic acid in whole wheat doughs: A theses for master of science / V.M. Clemons. – Department of food science and nutrition Brigham Young University, 1984. – 34 p.

69. Coradini D., Pellizzaro C., Marimpietri D., Abolafio G., Daidone M. G. Sodium butyrate modulates cell cycle-related proteins in HT29 human colonic adenocarcinoma cells // Cell Proliferation. 2000. №33. P.139–146.

70. Cosgrove D.J. Chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. Review // Pure Applied Chemistry. 1966. №16. P. 209–224.

71. Costa-Bauza A., Grases F., Gomila I., Rodriguez A., Prieto R.M., Tur F. A simple and rapid colorimetric method for determination of phytate in urine // Urol Res. 2012. № 40(6). P. 663-669.

72. Costello A.J.R, Glonek .T, Myers T.C. P-31 nuclear magnetic resonance-pH titrations of myoinositol hexaphosphate // Carbohydr Res. 1976. №46(2). P. 159-171.

73. Crea P., Robertis A.D., Stefano C.D., Sammartano S. Speciation of phytate ion in aqueous solution. Sequestration of magnesium and calcium by phytate at different temperatures and ionic strengths, in NaCl_{aq} // Biophysical Chemistry. 2006. №124. P. 18–26.

74. Deshpande S.S., Damodaran S. Effect of phytate on solubility, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin // Journal of Food Science. 1989. №54. P.695–699.

75. Dodge G.R., Jimenez S.A. Glucosamine sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes // Osteoarthr. Cartil. 2003. №11. P. 424–432.

76. Dost K., Tokul O. Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phase high performance liquid chromatography // Anal. Chim. Acta. 2006. №558. P. 22–27.

77. El-Harakany A.A., Abdel Halima F.M., Barakat A.O. Dissociation constants and related thermodynamic quantities of the protonated acid form of tris-(hydroxymethyl)-aminomethane in mixtures of 2-methoxyethanol and water at different temperatures // J. Electroanal. Chem. 1984. №162(1-2). P. 285–305.
78. El-Sherbiny Y.M., Cox M.C., Ismail Z.A., Shamsuddin A.M., Vucenik I. G0/G1 arrest and S phase inhibition of human cancer cell lines by inositol hexaphosphate (IP₆) // Anticancer Research. 2001. №21(4A). P. 2393–2403.
79. Felix G., Costa-Bauza A., Prieto R.M. Renal lithiasis and nutrition // Nutrition Journal. 2006. №5, P. 23-27.
80. Gordan D.T., Chao L.S. Relationship of components in wheat bran and spinach to iron bioavailability in the anemic rat // Journal of Nutrition. 1984. №114(3). P. 350-353.
81. Graf E., Empson K.L., Eaton J.W. Phytic acid: A natural antioxidant // Journal of Biological Chemistry. 1987. №262. P.11647-11650.
82. Graf E., Mahoney J.R., Bryant R.G., Eaton J.W. Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site // Journal of Biological Chemistry. 1984. №259(6). P. 3620-3624.
83. Grases F., Costa-Bauza A., Ramis M., Montesinos V., Conte A. Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology // Clinica Chimica Acta. 2002. №322. P. 29–36.
84. Grases F., March J.G., Prieto R.M., Simonet B.M., Costa-Bauza A., Garcia-Raja A. Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people – dietary effects on phytate excretion // Scandinavian Journal of Urology and Nephrology. 2000. №34. P. 162–164.
85. Greiner R., Konietzny U. Phytase for food application // Food Technology and Biotechnology. 2006. №44(2). P. 125–140.
86. Grynszan F., Cheryan M. Calcium phytate. Effect of pH and molar ratio on in vitro solubility // JAOCS. 1983. №60(10). P. 1761-1764.

87. Haber F., Weiss J.J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts // *Proc. R. Soc. London Ser. A.* 1934. Vol.147. P. 332-351.
88. Hallberg L., Brune M., Rossander L. Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate // *Am. J. Clin. Nutr.* 1989. №49. P. 140–144.
89. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation // *FEBS let.* 1992. Vol.307. №1. P. 108-112.
90. Harbach A.P.R., Mara C.R. da Costa, Soares A.L., Bridi A.M., Shimokomaki M., Caio A. da Silva, Elza I. Ida. Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance // *Food Chemistry.* 2007. №100. P 1630–1633.
91. Harris D.C., Aisen P. Facilitation of Fe(II) autoxidation by Fe(III) complexing agents // *Biochim. Biophys. Acta.* 1973. Vol. 329. №1. P. 156-158.
92. Harris C.M., Massey V. The reaction of reduced xantine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. №13. P. 8370-8379.
93. Hatzack F., Hubel F., Zhang W., Hansen P.E., Rasmussen S.K. Inositol phosphates from barley low-phytate grain mutants analysed by metal–dye detection HPLC and NMR // *Biochem J.* 2001. №354. P. 473–480.
94. Hawkins Ph.T., Poyner D.R., Jackson T.R. et al. Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate // *J. Biochem.* 1993. №294. P. 929-934.
95. Hodzic A., Madronich S., Bohn B., Massie S., Menut L., Wiedinmyer C. Wildfire particulate matter in Europe during summer 2003: meso-scale modeling of smoke emissions, transport and radiative effects // *Atmos. Chem. Phys.* 2007. № 7. P. 4043-4064.
96. Houston M., Esteves A., Chumlev P., Aslan M., Marclund S., Parks D.A., Freeman B.A. Binding of xantine oxidase to vascular endothelium. Kinetic

characterization and oxidative impairment of nitric signaling oxide-dependent signaling // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol.274. №8. P. 4985-4994.

97. Hu H.L., Wise A., Henderson C. Hydrolysis of phytate and inositol tri-, tetra-, and penta-phosphates by the intestinal mucosa of the pig // *Nutrition Research.* 1996. №16. P. 781–787.

98. Inagawa J., Kiyosawa, I., Nagasawa T. Effect of phytic acid on the digestion of casein and soyabean protein with trypsin, pancreatin and pepsin // *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi.* 1987. №40 P. 367–373.

99. Iqbal T. H., Lewis K.O., Cooper B. T. Phytase activity in the human and rat small intestine // *Gut.* 1994. №35. P. 1233–1236.

100. Jariwalla R.J., Sabin R., Lawson S., Herman Z.S. Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cations by dietary phytate // *Journal of Applied Nutrition.* 1990. №42. P. 18–28.

101. Kallet R.H., Jasmer R.M., Luce J.M. et al. The treatment of acidosis in acute lung injury with tris-hydroxymethyl aminomethane (THAM) // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2000. №161(4). P. 1149–1153.

102. Kamble R.M., Singh S.G., Singh S. HPLC methylparabene // *E-J. Chem.* 2011. Vol. 8.№1. P. 340–346.

103. Katayama T. Effects of dietary myo-inositol or phytic acid on hepatic concentrations of lipids and hepatic activities of lipogenic enzymes in rats fed on corn starch or sucrose // *Nutrition Research.* 1997. №17. P. 721–728.

104. Kaufman H. W., Kleinberg I. Effect of pH on calcium binding by phytic acid and its inositol phosphoric acid derivatives and on the solubility of their calcium salts // *Archives of Oral Biology.* 1971. №16. P. 445–460.

105. Kemme P.A., Jongbloed A.W., Mroz Z., Kogut J., Beynen A.C. Digestibility of nutrients in growing-finishing pigs is affected by *Aspergillus niger* phytase, phytate and lactic acid levels. 1. Apparent ileal digestibility of amino acids // *Livestock Production Science.* 1999. №58. P. 107–117.

106. Khatiwada J., Verghese M., Davis Sh., Williams L.L. Green tea, phytic acid and inositol in combination reduced the incidence of azoxymethane-

induced colon tumors in fisher 344 male rats // *J. Med. Food*. 2011. №14 (11). P. 1313–1320.

107. Kim S.M., Rico C.W., Lee S.C., Kang M.Y. Modulatory effect of rice bran and phytic acid on glucose metabolism in high fat-fed C57BL/6N mice // *JCBN Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2010. №47. P. 12-17.

108. Klevay L.M. Coronary heart disease: The zinc/copper hypothesis // *American Journal of Clinical Nutrition*. 1975. №28. P. 764–774.

109. Krohn K., Khanbabae K., Rieger H. Transition-metal-catalyzed oxidations 2. Titanium or zirconium-catalyzed selective dehydrogenation of benzyl alcohols to aldehydes and ketones with tert-butyl hydroperoxide // *Chem. Ber*. 1990. №6. P. 1357-1361.

110. Konietzny U., Greiner R. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in food // *Braz. J. Microbiol*. 2003. №34. P. 283-300.

111. Kumar V., Sinha A.K., Makkar H.P.S., Becker K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review // *Food Chemistry*. 2010. №120. P. 945–959.

112. Kwanyuen P., Burton J.W. A simple and rapid procedure for phytate determination in soys and soy products // *J. AOCS*. 2005. №80. P. 81–85.

113. Larsson O., Barker C.J., Sjöholm A., Carlqvist H., Michell R.H., Bertorello A. Inhibition of phosphatases and increased Ca²⁺ channel activity by inositol hexaphosphate // *Science*. 1997. №278. P. 471–474.

114. Latta M., Eskin M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination // *J. Agric. Food Chem*. 1980. №28. P. 1313–1315.

115. Lee K.-M., Kang H.-S., Yun C.-H., Kwak H.-S. Potential in vitro protective effect of quercetin, catechin, caffeic acid and phytic acid against ethanol-induced oxidative stress in SK-Hep-1 cells // *Biomol. Ther. (Seoul)*. 2012. №20(5). P. 492–498.

116. Lee S.H., Park H.J., Chun H.K., Cho S.Y., Cho S.M., Lillehoj H.S. Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice // *Nutrition Research*. 2006. № 26(9). P. 474–479.

117. Leeson S. Recent Advances in Animal Nutrition in Australia / S. Leeson Armidale. – NSW: The University of New England, 1993. 198p.
118. Leva E., Rapoport S. A method for the determination of phytate phosphorus in blood // J. Biol. Chem. 1941. №141. P. 343-348.
119. Liang Z., Leslie J., Adebawale A., Ashraf M., Eddington N.D. Determination of the nutraceutical, glucosamine hydrochloride, in raw materials, dosage forms and plasma using pre-column derivatization with ultraviolet HPLC // J. Pharm. Biomed. Anal. 1999. №20(5). P. 807-814.
120. Lide D.R. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 90ed. – New York: CRC Press, 2010. 2760 p.
121. Lönnerdal B. Phytic acid-trace element (Zn, Cu, Mn) interactions // International Journal of Food Science and Technology. 2002. №37. P. 749–758.
122. Lopez H.W., Leenhardt F., Coudray C., Remesy C. Minerals and phytic acid interactions: Is it a real problem for human nutrition // International Journal of Food Science and Technology. 2002. №37. P. 727–739.
123. Maddlach V.T., Kurnick A.A., Reld B.L. Phytic acid // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1964. №115. P. 391-402.
124. Mali G., Sala M., Ccaron Ar., On I., Kau Ccaron I., Ccaron V.C., Kolar J. Insight into the short-range structure of amorphous iron inositol hexaphosphate as provided by (31)P NMR and Fe X-ray absorption spectroscopy // J. Phys. Chem. B. 2006. №110(46). P. 23060-23067.
125. March J.G., Villacampa A.I., Grases F. Enzymatic-spectrophotometric determination of phytic acid with phytase from *Aspergillus ficuum* // Analytica Chimica Acta. 1995. №300. P. 269-272.
126. Markley J.L., Anderson M.E., Cui Q., Eghbalnia H., Lewis I.A., Hegeman A.D., Li J., Schulte C.F., Sussman M.R., Westler W.M., Ulrich E.L., Matyka S., Korol W., Bogusz G. The retention of phytin phosphorus from diets with fat supplements in broiler chickens // Animal Feed Science and Technology. 1990. №31. P. 223–230.

127. Mayr G.W. A novel metal–dye detection system permits picomolar-range h.p.l.c. analysis of inositol polyphosphates from non-radioactively labelled cell or tissue specimens // *Biochem J.* 1988. №254. P.585–591.
128. Meulyzer M., Vachon P., Beaudry F., Vinardell T., Richard H., Beauchamp G., Laverty S. Comparison of pharmacokinetics of glucosamine and synovial fluid levels following administration of glucosamine sulphate or glucosamine hydrochloride // *Osteoarthritis and cartilage.* 2008. №16(9). P. 973-979.
129. Midorikawa K., Murata M., Oikawa S., Hiraku Y., Kawanishi S. Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2001. №288(3). P. 552–557.
130. Miyamoto S., Murota K., Kuwataz G., Imai M. et al. Antioxidant activity of phytic acid hydrolysis products on iron ion-induced oxidative damage in biological system // *ACS Symposium Series; DC, Washington, 2002. Ch. 18. P. 241-250.*
131. Muraoka S., Miura T. Inhibition of xanthine oxidase by phytic acid and its antioxidative action // *Life Sciences.* 2004. №74. P. 1691–1700.
132. Nadendla R.R. Principles of organic medicinal chemistry. New Age International (P) Ltd., Publishers (New Delhi and all.), 2005. – 331 p.
133. Nielsen A.V.F., Tetens I., Meyer A.S. Potential of Phytase-Mediated Iron Release from Cereal-Based Foods: A Quantitative View // *Nutrients.* 2013. №5. P. 3074-3098.
134. No H.K., Meyers S.P. Preparation and characterization of chitin and chitosan – a review // *Journal of aquatic food product technology.* 1995. Vol.4. №2. P. 27-52.
135. Oatway L., Vasanthan T., Helm J. Phytic acid // *Food Reviews International.* 2001. №17(4). P. 419-431.

136. Otake T., Mori H., Morimoto M. Anti-HIV-1 activity of myo-inositol hexaphosphoric acid (IP₆) and myo-inositol hexasulfate (IS₆) // *Anticancer Research*. 1999. №19. P. 3723–3726.
137. Otake T., Shimonaka H., Kanai M. Inhibitory effect of inositol hexasulfate and inositol hexaphosphoric acid (phytic acid) on the proliferation of the human immunodeficiency virus (HIV) in vitro // *Kansenshogaku Zasshi*. 1989. №63. P. 676–683.
138. Park H.-R., Ahn H.-J., Kim S.-H., Lee C.-H., Byun M.-W., Lee G.-W. Determination of the phytic acid levels in infant foods using different analytical methods // *Food Control*. 2006. №17. P. 727–732.
139. Persson H., Türk M., Nyman M., Sandberg A.S. Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates // *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1998. №46. P. 3194–3200.
140. Pierzynski G.M. (ed.) *Methods of Phosphorus Analysis for Soils, Sediments, Residuals, and Waters*. North Carolina State University, Southern Cooperative Series Bulletin No. 396, 2004. 110 p.
141. Piloty O., Ruff O. Ueber einige amino-alkohole der Fettreihe // *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1897. V.30(2). P. 2057-2068.
142. Radi R., Bush K.M., Cosgrove T.P., Freeman B.A. Reaction of xantine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma // *Arch. Biochem. Biophys*. 1991. Vol. 286. №. P. 117-125.
143. Reddy N.R., Sathe Sh.K. *Food phytates. Biosynthesis of phytate in food grains and seeds* / N.R. Reddy, Sh.K. Sathe. – Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 2002. – 280 p.
144. Rickard S.E., Thompson L.U. Interactions and biological effects of phytic acid // *ACS Symposium Series* № 662. 1997. P. 294–312.
145. Rouquette M., Page S., Bryant R., Benboubetra M., Stevens C.R., Blake D.R., Whish W.D., Harrison R., Tosh D. Xantine oxidoreductase is asymmetrically localized on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture // *FEBS Lett*. 1998. Vol. 426. №3. P. 397-401.

146. Saied I.T., Shamsuddin A.M. Up-regulation of the tumour suppressor gene p53 and WAF1 gene expression by IP₆ in HT-29 human colon carcinoma cell line // *Anticancer Research*. 1998. Vol. 18(3). P. 1479–1484.
147. Sala M., Makuc D., Kolar J., Plavec J., Pihlar B. Potentiometric and ³¹P NMR studies on inositol phosphates and their interaction with iron (III) ions // *Carbohydrate Research*. 2011. №346. P. 488–494.
148. Samokyszyn V.M., Thomas C.E., Reif D.W., Saito M., Aust S.D. Release of iron from ferritin and its role in oxygen radicals toxicities // *Drug Metab. Rev.* 1988. Vol.19. №3-4. P. 283-303.
149. Sandberg A.S., Larsen T., Sandstrom B. High dietary calcium level decreases colonic phytate degradation in pigs fed a rapeseed diet // *Journal of Nutrition*. 1993. №123. P. 559–566.
150. Sandström B., Cederblad A., Stenquist B., Andersson H. Effect of inositol hexaphosphate on retention of zinc and calcium from the human colon // *European Journal of Clinical Nutrition*. 1990. №44. P. 705–708.
151. Sandy J.D., Gamett D., Thompson V., Verscharen C. Chondrocyte-mediated catabolism of aggrecan: aggrecanase-dependent cleavage induced by interleukin-1 or retinoic acid can be inhibited by glucosamine // *Biochem. J.* 1998. №335. P. 59–66.
152. Selle P.H., Ravindran V., Caldwell R.A., Bryden W.L. Phytate and phytase: Consequences for protein utilisation // *Nutrition Research Reviews*. 2000. №13. P. 255–278.
153. Shamsuddin A.M. Anti-cancer function of phytic acid // *International Journal of Food Science and Technology*. 2002. №37(7). P. 769–782.
154. Shevchenko S.M., Semenov S.G., Kiselev G.V. Change in conformation energy in myoinositol-4,5-diphosphate caused by change in phosphate-group charge // *Theoretical and Experimental Chemistry*. 1984. Vol. 20. Issue 2. P. 212-216.

155. Shi X.L., Dalat N.S. Flavoenzymes reduce vanadium (V) and molecular oxygen and generate hydroxyl radical // *Arch. Biochem. Biophys.* 1991. Vol.289. №2. P. 355-361.
156. Shi X.L., Mao Y., Knapton A.D., Ding M., Rojanasakul Y., Gannett P.M., Dalat N.S., Liu K. Reaction of Cr(VI) with ascorbate and hydrogen peroxide generates hydroxyl radicals and causes DNA damage: role of a Cr (IV)-mediated Fenton-like reaction // *Carcinogenesis*.1994. Vol.15. №11. P. 2475-2478.
157. Sorour M.A., Ohshima T. Inhibitory effects of phytic acid as a natural antioxidant in prevention of fish oil peroxidation // *Lucrari Stiintifice Seria Zootehnie*. 2013. Vol. 53. P. 241-246.
158. Stefano C. De, Giuffre O., Milea D., Sammartano S. Speciation of phytate ion in aqueous solution. Non covalent interactions with biogenic polyamines // *J. Chemical Speciation and Bioavailability*. 2002. №15(2). P. 29–36.
159. Surapaneni K.M., Venkataramana G. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with osteoarthritis // *Indian J. Med. Sci.* 2007. Vol. 61. №1. P. 9-14.
160. Talamond P., Gallon G., Guyot J.P., Mbome Lape I., Treche S. Comparison of high-performance ion chromatography and absorptiometric methods for the determination of phytic acid in food samples // *Analisis*. 1998. №26. P. 396–400.
161. Thompson D.B., Erdman J.W. Phytic Acid Determination in Soybeans // *Journal of Food Science*. 1982. Vol. 47(2). P. 513–517.
162. Thompson L.U., Button C.L., Jenkins D.J.A. Phytic acid and calcium affect the in vitro rate of navy bean starch digestion and blood glucose response in humans // *American Journal of Clinical Nutrition*. 1987. №46. P. 467–473.
163. Tiku M.L., Narla H., Jain M., Yalamanchili P. Glucosamine prevents in vitro collagen degradation in chondrocytes by inhibiting advanced lipoxidation reactions and protein oxidation // *Arthritis Research & Therapy*. 2007. Vol.9. № 4. R76. P. 1-10.

164. Tiku M.L., Yan Y.P., Chen K.Y. Hydroxyl radical formation in chondrocytes and cartilage as detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy using spin trapping reagents // *Free Radic Res.* 1998. Vol.29. №3. P. 177-187.
165. Torres J., Dominguez S., Cerda M.F., Obal G., Mederos A., Irvine R.F., Diaz A., Kremer C. Solution behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of multivalent cations. Prediction of a neutral pentamagnesium species under cytosolic/nuclear conditions // *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2005. №99(3). P. 828–840.
166. Torres J., Veiga N., Ganche J.S., Dominguez S., Mederos A., Sundberg M., Sanchez A., Castiglioni J., Diaz A., Kremer C. Interaction of myo-inositol hexakisphosphate with alkali and alkaline earth metal ions: Spectroscopic, potentiometric and theoretical studies // *J. of Molecular Structure.* 2008. №874. P. 77–88.
167. Tran H.C., Brooks J., Gadwal S., Bryant J.L., Shamsuddin A.M., Lunardi-Iskandar Y. Effect of inositol hexaphosphate (IP₆) on AIDS neoplastic Kaposi's sarcoma, iatrogenic Kaposi's sarcoma and lymphoma // *Proceedings of the American Association for Cancer Research.* 2003. №44. P. 499–506.
168. Turner B.L., Cheesman A.W., Godage H.Y., Riley A.M., Potter B.V.L. Determination of neo- and D-chiro-inositol hexakisphosphate in soils by solution ³¹P NMR spectroscopy // *Environ. Sci. Technol.* 2012. №46. P. 4994–5002.
169. Veiga N., Torres J., Domínguez S., Mederos A., Irvine R.F., Díaz A., Kremer C. The behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of magnesium(II) and calcium(II): Protein-free soluble InsP₆ is limited to 49 μM under cytosolic/nuclear conditions // *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2006. №100. P. 1800-1810.
170. Vohra P., Gray G.A., Kratzer F.H. Phytic acid-metal complexes // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1965. №120. P. 447-449.

171. Vucenik I., Kalebic T., Tantivejkul K., Shamsuddin A.M. Novel anticancer function of inositol hexaphosphate (IP₆): Inhibition of human rhabdomyosarcoma in vitro and in vivo // *Anticancer Research*. 1998. №18. P. 1377–1384.
172. Vucenik I., Sakamoto K., Bansal M., Shamsuddin A.M. Inhibition of rat mammary carcinogenesis by inositol hexaphosphate (phytic acid). A pilot study // *Cancer Letter*. 1993. №75. P. 95–102.
173. Vucenik I., Shamsuddin A.M. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP₆) and inositol: From laboratory to clinic // *Journal of Nutrition*. 2003. №133. P. 3778–3784.
174. Vucenik I., Tantivejkul K., Zhang Z.S., Cole K.E., Saied I., Shamsuddin A.M. IP₆ treatment of liver cancer. I. IP₆ inhibits growth and reverses transformed phenotype in HepG2 human liver cancer cell line // *Anticancer Research*. 1998. №18. P. 4083–4090.
175. Vucenik I., Zhang Z.S., Shamsuddin A.M. IP₆ in treatment of liver cancer. II. Intra-tumoural injection of IP₆ regresses pre-existing human liver cancer xenotransplanted in nude mice // *Anticancer Research*. 1998. №18(6A). P. 4091–4096.
176. White P.J., Broadley M.R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine: Research review // *New Phytologist*. 2009. №182. P. 49–84.
177. Wise A. Blood lead levels after chronic feeding to mice of lead acetate with calcium phytate in the diet // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1982. №29. P. 550–553.
178. Wise A. Dietary factors determining the biological activities of phytate // *Nutrition Abstracts and Reviews*. 1983. №53. P. 791–806.
179. Yanga C.-Y., Hsua C.-H., Tsai M.-L. Effect of crosslinked condition on characteristics of chitosan/tripolyphosphate/genipin beads and their application

in the selective adsorption of phytic acid from soybean whey // Carbohydrate Polymers. 2011. №86. P. 659– 665.

180. Yong P.R., Nandi U.S., Kallenbach N.R. Binding of mercury(II) to poly(dA-dT) studied by proton nuclear magnetic resonance // Biochemistry. 1982. Vol.21. №1. P. 62-66.

181. Yoon J.H., Thompson L.U., Jenkins D.J.A. The effect of phytic acid on in vitro rate of starch digestibility and blood glucose response // American Journal of Clinical Nutrition. 1983. №38. P. 835–842.

182. Yu S., Cowieson A., Gilbert C., Plumstead P., Dalsgaard S. Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP1-5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin // J. Anim. Sci. 2012. №90. P. 1824-1832.

183. Zi X., Singh R.P., Agarwal R. Impairment of erbB1 receptor and fluid phase endocytosis and associated mitogenic signalling by inositol hexaphosphate in human prostate carcinoma DU145 cells // Carcinogenesis. 2000. №21. P. 2225–2235.

184. Zolnai Z. New bioinformatics resources for metabolomics // Pacific Symposium on Biocomputing. 2007. P. 157-168.

ПРИЛОЖЕНИЯ:

Приложение 1. Проект фармакопейной статьи предприятия.

Проект ФСП Ксифит гель для наружного применения

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № _____

Дата регистрации « ____ » _____ 201 ____ г.

ООО «СОЗИДАТЕЛЬ»,

127299, Россия, г. Москва, ул. Приорова, 2а

(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное удостоверение, адрес)

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

_____ (номер)

Ксифит

торговое наименование лекарственного препарата

-

международное непатентованное или химическое наименование

гель для наружного применения

лекарственная форма, дозировка

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ООО «Созидатель», Россия

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

ООО «Созидатель», Россия

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)

ООО «Созидатель», Россия

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

ООО «Созидатель», Россия

СПЕЦИФИКАЦИЯ

Ксифит, гель для наружного применения

ООО «Славянская аптека», Россия

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный	Прозрачный гель оранжевого цвета без включений.
Подлинность	<p>1. Качественные химические реакции на фосфор (ГФ XI, вып.1, с. 159).</p> <p>2. Спектрофотометрия (натрия гиалуронат)</p> <p>3. Спектрофотометрия (анион фитиновой кислоты)</p> <p>4. ВЭЖХ (метилпарабен)</p>	<p>1. Препарат должен давать качественные реакции на фосфор.</p> <p>2. Электронный спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения натрия гиалуроната, в области 450-600 нм должен соответствовать электронному спектру поглощения градуировочных растворов натрия гиалуроната, измеренных в этих же условиях.</p> <p>3 Электронный спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения фитиновой кислоты, в области 450-600 нм должен соответствовать электронному спектру поглощения раствора СО фитиновой кислоты, измеренного в этих же условиях.</p> <p>4. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора,</p>

	<p>5. ВЭЖХ (протонированный ксимедон)</p> <p>6. ¹³C-ЯМР (трисамин)</p>	<p>приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме градуировочных растворов метилпарабена</p> <p>5. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме градуировочных растворов ксимедона.</p> <p>6. Реперная полоса (63±1 м.д.) должна соответствовать положению для стандартного раствора трисамина.</p>
рН среды	Потенциометрически, ГФ XII, стр. 89	От 6,4 до 6,8
Масса содержимого	НД	От 47,5 до 52,5 мл
Количественное определение:		
протонированный ксимедон	ВЭЖХ	от 9,5 до 10,5 (на 100 г геля)
Анион фитиновой кислоты	Спектрофотометрия	от 11,74 до 12,36 г (на 100 г геля)
Натрия гиалуронат	Спектрофотометрия	от 0,837 до 0,963 г (на 100 г геля)
Метилпарабен	ВЭЖХ	от 0,064 до 0,096 г (на 100 г геля)

Микробиологическая чистота	ГФ XII, изд. №1, с. 160	Категория 2
Упаковка	НД	По 50 г в алюминиевые тубы.
Маркировка	НД	В соответствии с ФС
Транспортировка	В соответствии с РД 9301-006-05749470-93	
Хранение	НД	В прохладном месте, при температуре от 0 до +10 ⁰ С.
Срок годности	3 года	

Состав

Фитиновая кислота (50%) - 12,00 г
(593648 ALDRICH, Beilstein Registry Number 2201952)

Ксимедон - 10,00 г
(№ ФС-000205, порошок, Кристалл ГосНИИ, Россия)*

Вспомогательных веществ:

Трисамин - 1,00 г
(DAB/PhEur)*

Натрия гиалуроната - 0,90 г
(BP/USP)*

Этанол (96%) - 0,80 г
(ГОСТ 5962-67)

Метилпарабена (нипагин) - 0,08 г
(BP/USP)*

Воды очищенной - до 100,0 г
(ФС 42-2619-97)

* - Ссылки даются на действующие издания.

Описание. Прозрачный гель оранжевого цвета без включений.

Подлинность. а) 3 г геля с 1-2 мл HCl конц. осаждают 15 мл ацетонитрила. 1 мл надосадочной жидкости дает характерную реакцию на фосфаты (ГФ XI, вып.1, с. 159).

б) Электронный спектр поглощения раствора, приготовленный для количественного определения натрия гиалуроната и измеренный в области 450-600 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм должен соответствовать электронному спектру поглощения градуировочных растворов натрия гиалуроната, измеренных в этих же условиях.

в) Электронный спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения фитиновой кислоты, в области 450-600 нм должен соответствовать электронному спектру поглощения раствора СО фитиновой кислоты, измеренного в этих же условиях.

г) Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения метилпарабена, должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме градуировочных растворов метилпарабена

д) Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения ксимедона, должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме градуировочных растворов ксимедона

е) Реперная полоса (63 ± 1 м.д.) должна соответствовать положению для стандартного раствора трисамина.

рН от 6,4 до 6,8.

10 г препарата растворяют в 100 мл воды и измеряют рН полученного раствора (ГФ XI, потенциометрически).

Масса содержимого.

Средняя масса содержимого должна быть от 47,5 до 52,5 мл

Определение проводят на трёх упаковках. Взвешивают тубу с содержимым, затем разрезают тубу, извлекают содержимое, промывают тубу водой, высушивают и вновь взвешивают. По разности находят массу содержимого упаковки.

Количественное определение.

Протонированный ксимедон

От 9,5 до 10,5 (на 100 г геля)

Стандартные субстанции: Ксимедон в соответствии со спецификацией фирмы.

Растворитель: Ацетонитрил;
Вода дистиллированная.

Приготовление растворов ксимедона.

Стандартный раствор 1: 50 мг (точная навеска) стандартной субстанции ксимедона помещают в стакан на 50 мл, добавляют 9,95 г ацетонитрила и перемешивают до полного растворения ксимедона. 1 г полученного раствора помещают в колбу на 500 мл и доводят до метки водой дистиллированной (соответствует 50% ожидаемой концентрации испытуемого раствора).

Стандартный раствор 2: 100 мг (точная навеска) стандартной субстанции ксимедона помещают в стакан на 50 мл, добавляют 9,90 г ацетонитрила и перемешивают до полного растворения ксимедона. 1 г полученного раствора помещают в колбу на 500 мл, доводят до метки водой дистиллированной и перемешивают (соответствует 100% ожидаемой концентрации испытуемого раствора).

Стандартный раствор 3: 150 мг (точная навеска) стандартной субстанции ксимедона помещают в стакан на 50 мл, добавляют 9,85 г ацетонитрила и перемешивают до полного растворения

ксимедона. 1 г полученного раствора помещают в колбу на 500 мл и доводят до метки водой дистиллированной (соответствует 150% ожидаемой концентрации испытуемого раствора).

Испытуемый раствор : Около 3 г (точная навеска) геля помещают в мерный стакан вместимостью 50 мл, прибавляют 15 мл воды, перемешивают и по каплям добавляют 2 мл концентрированной хлористоводородной кислоты. К полученному раствору добавляют 15 мл ацетонитрила (х.ч.) и через 30 мин раствор с выпавшим хлопьевидным бурым осадком количественно переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют со скоростью 6000 об/мин в течение 10 мин. После центрифугирования надосадочную жидкость переносят в стакан вместимостью 100 мл, фильтруя через фильтр «Белая лента». Центрифужную пробирку трехкратно промывают 5 мл воды и, фильтруя, переносят в тот же стакан. Фильтр промывают 5 мл воды в тот же стакан, фильтрат нейтрализуют аммиаком водным до рН 6,5 – 7,0 (контроль осуществляют по универсальной индикаторной бумаге). Полученный раствор фильтруют через двойной складчатый фильтр «Синяя лента» в мерную колбу вместимостью 100 мл. Объем доводят до метки водой.

Вводят стандартные растворы и испытуемый раствор три раза каждый.

Условия хроматографирования:

Колонка – Discovery C18 (5µm)

Детектор – спектрофотометрический с рабочей длиной волны 309 нм

Подвижная фаза (ПФ) – смесь ацетонитрил: вода (21:79);

Скорость потока ПФ – 1 мл/мин

Объем вводимой пробы – 20 мкл

Температура колонки – 25 °С.

Оценка пригодности хроматографической системы системы:

Хроматографическая система считается пригодной, если:

- относительное стандартное отклонение площадей пиков ксимедона, полученное для трёх вводов стандартного раствора 2, составляет не более 2%.

Расчёты.

Вычисления основаны на измерении площадей пиков.

Расчёт основан на линейной калибровочной функции производной от трёх стандартных растворов, для которой нет необходимости включать начало координат (трёх-точечная калибровка), и которая не включает взвешивания.

Формула линейной зависимости.

Вычисляют наклон калибровочной кривой в единицах площади на миллиграмм (a) по формуле:

$$a = \frac{S(x*y) - S*Y}{Sx^2 - (Sx)^2:n}$$

где y – средняя площадь пиков для всех стандартных растворов;

x – навеска стандартной субстанции, в миллиграммах;

- Y – площадь пика на хроматограмме стандартного раствора;
 Sx^2 – сумма квадратов всех значений x;
 $(Sx)^2$ – квадрат суммы всех значений x;
 n – число калибровочных точек.

Вычисляют точку пересечения калибровочной кривой с осью «у» в единицах площади (b) по формуле:

$$b=y-a*x,$$

где x – средняя навеска стандартной субстанции, в миллиграммах.

Содержание ксимедона в процентах (относительно номинального содержания) рассчитывают по формуле:

$$X\% = \frac{(RT-b)*100}{a*V*WT*P},$$

где RT – площадь пика ксимедона на хроматограмме испытуемого раствора;

WT – навеска препарата, взятая для приготовления испытуемого раствора в граммах;

b – точка пересечения калибровочной кривой с осью «у» в единицах площади на миллиграмм;

$$V = \frac{\text{общий объем стандартного раствора}}{\text{общий объем испытуемого раствора}}$$

P – содержание ксимедона в 100 г геля, указанное на этикетке, в миллиграммах.

Анион фитиновой кислоты

От 11,74 до 12,36 г (на 100 г геля)

Около 3 г (точная навеска) геля помещают в мерный стакан вместимостью 50 мл, прибавляют 15 мл воды, перемешивают и по каплям

добавляют 2 мл концентрированной хлористоводородной кислоты. К полученному раствору добавляют 15 мл ацетонитрила (хч) и через 30 мин раствор с выпавшим хлопьевидным бурым осадком количественно переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 6000 об/мин. После центрифугирования надосадочную жидкость переносят в стакан вместимостью 100 мл, фильтруя через фильтр «Белая лента». Центрифужную пробирку трехкратно промывают 5 мл воды и, фильтруя, переносят в тот же стакан. Фильтр промывают 5 мл воды в тот же стакан, фильтрат нейтрализуют аммиаком водным до рН 6,5 – 7,0 (контроль осуществляют по универсальной индикаторной бумаге). Полученный раствор фильтруют через двойной складчатый фильтр «Синяя лента» в мерную колбу вместимостью 100 мл. Объем доводят до метки водой.

Реактив Вэйда готовили непосредственно перед анализом, смешивая раствор А (0,3240 г сульфосалициловой кислоты в 100 мл воды) с раствором Б (0,0324 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 100 мл воды) в соотношении 1:1 по объёму (1 мл реагента содержал 0,2 $\mu\text{моль}$ железа). Для построения калибровочной кривой и анализа использовали молярное соотношение «фитиновая кислота-реагент» – 1:3. В качестве холостого опыта использовали пробу, в которой фитиновая кислота отсутствует.

Для калибровочного графика использовали по 5 мл растворов фитиновой кислоты концентраций ($\mu\text{моль/л}$) 150, 300, 450, 600, 750 и 1000, которые переносили в колбу ёмкостью 50 мл, и после добавления 30 мл реагента доводили до метки водой очищенной.

Количественное содержание аниона фитиновой кислоты в исследуемом растворе находят по градуировочному графику.

Натрия гиалуронат

От 0,837 до 0,963 г (на 100 г геля)

К 3 г геля прибавляют 1-2 мл соляной кислоты концентрированной и 15 мл ацетонитрила. Через 30 мин раствор с выпавшим хлопьевидным бурым

осадком количественно переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 6000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают. Полученный осадок смывают водой и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки водой очищенной. К 2 мл полученного раствора, помещенного в пробирку с притертой пробкой, прибавляют 5 мл раствора натрия тетрабората, пробирку встряхивают и охлаждают в холодной воде. Плотно закрытую пробирку 15 минут кипятят на водяной бане. После охлаждения в холодной воде прибавляют 0,20 мл раствора карбазола. Плотно закрытую пробирку вновь 15 минут кипятят на водяной бане и затем охлаждают (испытуемый раствор). Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 530 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм спектрофотометрически. В качестве раствора сравнения используют холостой опыт, проведенный с 2 мл дистиллированной воды и всеми примененными реактивами начиная со слов «К 2 мл полученного раствора, помещенного в пробирку...».

Расчет содержания натрия гиалуроната основан на линейной калибровочной функции производной от трех градуировочных растворов.

Формула линейной зависимости.

Угловой коэффициент (a) и свободный член (b) линейной зависимости вычисляют по уравнениям:

$$a = \frac{3 \cdot (\sum m_i \cdot A_i) - \sum m_i \cdot \sum A_i}{3 \cdot \sum m_i^2 - (\sum m_i)^2}$$

$$b = \frac{\sum A_i \cdot \sum m_i^2 - \sum m_i \cdot (\sum m_i \cdot A_i)}{3 \cdot \sum m_i^2 - (\sum m_i)^2},$$

где A_i – оптические плотности градуировочных растворов;

m_i – навески натрия гиалуроната, взятые для приготовления градуировочных растворов;

Содержание натрия гиалуроната г/100 г геля (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(A-b) \cdot P}{a \cdot 100},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

P – содержание натрия гиалуроната в стандартном образце, %.

Примечание. 1. Приготовление раствора натрия тетрабората. В мерной колбе на 100 мл растворяют 0,95 г натрия тетрабората в серной кислоте концентрированной и доводят раствор до метки тем же растворителем. Используют свежеприготовленным.

2. Приготовление раствора карбазола. В мерной колбе на 100 мл растворяют 0,125 г карбазола в безводном этаноле и доводят раствор до метки тем же растворителем.

3. Приготовление градуировочных растворов натрия гиалуроната.

Готовят три серии образцов, содержащих 0,6 г, 0,8 г и 1,0 г (точные навески) стандартного образца натрия гиалуроната и всех ингредиентов геля в количествах, указанных в составе. После полной гомогенизации каждый из образцов анализируют в соответствии с методикой, начиная со слов «К 3 г геля прибавляют...».

Метилпарабен

От 0,064 до 0,096 г (на 100 г геля)

Около 3 г (точная навеска) геля помещают в мерный стакан вместимостью 50 мл, прибавляют 15 мл воды, перемешивают и по каплям добавляют 2 мл хлористоводородной кислоты концентрированной. К полученному раствору добавляют 15 мл ацетонитрила (хч). Через 30 мин

раствор с выпавшим хлопьевидным бурым осадком количественно переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 6000 об/мин. Надосадочную жидкость после центрифугирования переносят в стакан вместимостью 100 мл, фильтруя через фильтр «Белая лента». Центрифужную пробирку трехкратно промывают 5 мл воды и, фильтруя, переносят в тот же стакан. Фильтр промывают 5 мл воды в тот же стакан, фильтрат нейтрализуют аммиаком водным до рН 6,5 – 7,0 (контроль осуществляют по универсальной индикаторной бумаге). Полученный раствор фильтруют через двойной складчатый фильтр «Синяя лента» в мерную колбу вместимостью 100 мл. Объем доводят до метки водой очищенной.

К 1 мл полученного раствора прибавляют 9 мл элюента (испытуемый раствор) и хроматографируют.

Условия хроматографирования:

Колонка – Phenomenex® Luna 5u C18 100 A, 250×4,6 мм, 5 мкм

Детектор – спектрофотометрический с рабочей длиной волны 205 нм и 254 нм

Подвижная фаза (ПФ) – смесь ацетонитрил: вода (50:50);

Скорость потока ПФ – 1 мл/мин

Объем вводимой пробы – 20 мкл

Температура колонки – 25 °С.

После уравнивания колонки подвижной фазой, в хроматограф последовательно вводят по 20 мкл градуировочных растворов метилпарабена и испытуемого раствора, регистрируя не менее трех хроматограмм для каждого из растворов.

Расчет содержания метилпарабена основан на линейной калибровочной функции производной от трех градуировочных растворов.

Формула линейной зависимости.

Угловой коэффициент (а) и свободный член (b) линейной зависимости вычисляют по уравнениям:

$$a = \frac{3 \cdot (\sum m_i \cdot S_i) - \sum m_i \cdot \sum S_i}{3 \cdot \sum m_i^2 - (\sum m_i)^2}$$
$$b = \frac{\sum S_i \cdot \sum m_i^2 - \sum m_i \cdot (\sum m_i \cdot S_i)}{3 \cdot \sum m_i^2 - (\sum m_i)^2},$$

где S_i – площади пиков метилпарабена на хроматограммах градуировочных растворов;

m_i – навески метилпарабена, взятые для приготовления градуировочных растворов.

Содержание метилпарабена г/100 г геля (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(S - b) \cdot P}{a \cdot 100},$$

где S - площадь пика метилпарабена на хроматограмме испытуемого раствора;

P – содержание метилпарабена в стандартном образце, %.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Примечание. 1. Приготовление градуировочных растворов метилпарабена. Готовят три серии образцов, содержащих по 0,1 г, 0,2 г и 0,3 г (точные навески) стандартного образца метилпарабена и всех ингредиентов геля в количествах, указанных в составе. После полной гомогенизации каждый из образцов анализируют в соответствии с методикой, начиная со слов «К 3 г геля прибавляют...». 2. Проверка пригодности хроматографической

системы. Хроматографическая система считается пригодной, если:

- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика метилпарабена должно быть не более 2 %;
- фактор асимметрии пика метилпарабена должен быть не более 2,0;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику метилпарабена должна быть не менее 3000 теоретических тарелок.

Микробиологическая чистота.

Испытания проводят в соответствии с требованиями ОФС 42-0067-07 (категория 2).

Упаковка. По 50 г в алюминиевые тубы с навинчивающейся крышкой из полиэтилена. Каждую тубу вместе с инструкцией по применению помещают в пачку.

Вторичная и транспортная тара в соответствии с РД 9301-006-05749470-93.

Маркировка.

На тубе указывают:

- название препарата;
- состав (количество активных компонентов и консерванта) и лекарственную форму;
- способ применения;
- срок годности;
- название фирмы-производителя;
- номер серии;
- срок годности;

- условия отпуска из аптек;
- условия хранения;
- предупредительные надписи.

На пачке указывают:

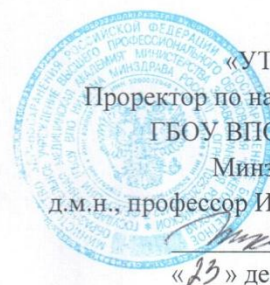
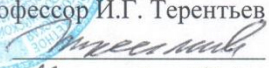
- торговое название препарата;
- МНН;
- состав (количество активных компонентов и консерванта) и лекарственную форму;
- массу препарата;
- способ применения;
- регистрационный номер;
- название фирмы-производителя, её адрес и логотип фирмы;
- номер серии и дату производства;
- срок годности;
- условия отпуска из аптек;
- условия хранения;
- предупредительные надписи;
- штрих-код.

Транспортирование. В соответствии с РД 9301-006-05749470-93

Хранение. В прохладном месте, при температуре от 0 до +10⁰С.

Срок годности. 3 года.

Приложение 2. Акты внедрения


«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по научной работе
ГБОУ ВПО «НижГМА»
Минздрава России
д.м.н., профессор И.Г. Терентьев

«23» декабря 2014 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации Сидоровой Марты Валерьевны на тему:
«Разработка и исследование комплексов фитиновой кислоты с биологически активными аминами как компонентов гидрофильных гелей» на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в научно-исследовательскую работу кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования

«Нижегородская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Комиссия в составе д.х.н., профессора, заведующего кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии Мельниковой Н.Б., к.х.н., доцента кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии Жильцовой О.Е., к.х.н., доцента кафедры общей химии Красильниковой Е.В. подтверждает использование результатов, полученных Сидоровой Мартой Валерьевной в ходе работы над кандидатской диссертацией «Разработка и исследование комплексов фитиновой кислоты с биологически активными аминами как компонентов гидрофильных гелей», в научно-исследовательской работе на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии.

д.х.н., профессор, заведующий кафедрой
фармацевтической
химии и фармакогнозии



Н.Б. Мельникова

к.х.н., доцент кафедры
фармацевтической
химии и фармакогнозии



О.Е. Жильцова

к.х.н., доцент кафедры
общей химии



Е.В. Красильникова

603005, г. Нижний Новгород, ул. Минина 10/1



«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по учебной работе
ГБОУ ВПО «НиЖГМА»
Минздрава России
д.м.н., профессор С.Н. Цыбусов

«25» декабря 2014 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации Сидоровой Марты Валерьевны на тему:
«Разработка и исследование комплексов фитиновой кислоты с биологически активными аминами как компонентов гидрофильных гелей» на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в учебную работу кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Комиссия в составе д.х.н., профессора, заведующего кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии Мельниковой Н.Б., к.х.н., доцента кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии Жильцовой О.Е., к.х.н., доцента кафедры общей химии Красильниковой Е.В. подтверждает использование результатов, полученных Сидоровой Мартой Валерьевной в ходе работы над кандидатской диссертацией «Разработка и исследование комплексов фитиновой кислоты с биологически активными аминами как компонентов гидрофильных гелей», в курсе обучения студентов III-V курсов фармацевтического факультета на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии.

д.х.н., профессор, заведующий кафедрой
фармацевтической
химии и фармакогнозии

Н.Б. Мельникова

к.х.н., доцент кафедры
фармацевтической
химии и фармакогнозии

О.Е. Жильцова

к.х.н., доцент кафедры
общей химии

Е.В. Красильникова

603005, г. Нижний Новгород, ул. Минина 10/1

«УТВЕРЖДАЮ»

Заведующий структурным
подразделением ГБОУ СПО НО
«Нижегородский медицинский базовый колледж»,
к.фарм.н., отличник здравоохранения РФ



И.А. Пегова

« 19 » декабря 2014 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации Сидоровой Марты Валерьевны на тему:
«Разработка и исследование комплексов фитиновой кислоты с биологически активными
аминами как компонентов гидрофильных гелей» на соискание учёной степени кандидата
фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в
научно-исследовательскую работу кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии
государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального
образования

«Нижегородская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Комиссия в составе к.б.н., председателя цикловой методической комиссии
Т.П. Зиминой; к.п.н., заслуженного учителя РФ, преподавателя Т.Н. Поповой и
методиста Л.И. Страшной подтверждает использование результатов,
полученных Сидоровой Мартой Валерьевной в ходе работы над кандидатской
диссертацией «Разработка и исследование комплексов фитиновой кислоты с
биологически активными аминами как компонентов гидрофильных гелей», в
научно-исследовательской и учебной работе фармацевтического отделения ГБОУ
СПО НО «Нижегородский медицинский базовый колледж».

к.б.н., председатель цикловой
методической комиссии

Т.П.Зиминая

к.п.н., заслуженный учитель РФ,
преподаватель

Т.Н. Попова

методист

Л.И. Страшнова

603109, г. Нижний Новгород, ул. Ильинская, д. 20

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «СОЗИДАТЕЛЬ»
Полухин И.В.
«14» января 2015г.

АКТ

об использовании результатов
кандидатской диссертационной работы
Сидоровой Марты Валерьевны

Комиссия в составе: председатель Полухин И.В., члены комиссии: Полухин О.В., Пьянзина И.П. составили настоящий акт о том, что результаты диссертационного исследования «Разработка и исследование комплексов фитиновой кислоты с биологически активными аминами как компонентов гидрофильных гелей» использованы ООО «СОЗИДАТЕЛЬ» (127299, Москва, ул.Приорова, д. 2а) в следующем виде:

1. Состав гидрофильного геля «Ксифит», предложенный в работе, внедряется в производство.

2. Данные проекта ФСП на гель «Ксифит» использованы в полном объеме.

Ответственные за внедрение:

Генеральный директор

Зав. Отделом инновационных проектов



Полухин И.В..

Пьянзина И.П..