

ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ И ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. А.Е. АРБУЗОВА –
ОБОСОБЛЕННОЕ СТРУКТУРНОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи



Чекунков Евгений Владимирович

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЦИТРУСОВОГО ПЕКТИНА
С НЕСТЕРОИДНЫМИ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ
И АНТИМИКРОБНЫМИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СРЕДСТВАМИ:
СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук,
доцент Милюков В.А.

Казань – 2024

Оглавление

Введение	6
ГЛАВА 1. Пектиновые полисахариды и лекарственные средства	14
на их основе (литературный обзор)	14
1.1 Пектиновые полисахариды: структура, физико-химические свойства, биологическая активность	14
1.1.1 Структура и получение пектиновых полисахаридов.....	14
1.1.2 Биологическая активность пектиновых полисахаридов	21
1.2 Химическая модификация пектиновых полисахаридов и перспективность применения полученных продуктов для медицины	27
1.2.1 Химическая модификация пектиновых полисахаридов	27
1.2.2 Формы систем для доставки лекарственных средств на основе пектина	38
1.2.3 Нестероидные противовоспалительные препараты	56
1.2.4 Антибиотики	59
2.1 Молекулярные комплексы пектиновых полисахаридов с НПВС	62
2.1.1 Молекулярные комплексы пектиновых полисахаридов	62
с ибупрофеном.....	62
2.1.2 Молекулярные комплексы пектиновых полисахаридов с АСК	72
2.1.3 Исследование термостабильности новых комплексов пектина с НПВС	77
2.1.4 Биологическая активность молекулярных комплексов пектина с НПВС	80
2.2 Комплексы полигалактуроната натрия с противомикробными препаратами	84
2.2.1 Комплексы полигалактуроната натрия с гидрохлоридом тетрациклина	84

2.2.2	Комплексы полигалактуроната натрия с амоксициллином	95
2.2.3	Исследование термостабильности новых комплексов полигалактуроната натрия с антибиотиками	101
2.2.4	Биологическая активность комплексов пектина с противомикробными препаратами	104
ГЛАВА 3. Показатели норм качества полученных соединений		109
3.1.	Методы подтверждения подлинности полученных соединений	109
3.2	Методы количественного определения полученных соединений	112
3.2.1	Методика определения ибупрофена в П/ИБП 6	112
3.2.2	Методика определения тетрациклина в ПГNa/ТС 5	112
3.3	Испытания на микробиологическую чистоту	113
ГЛАВА 4. Экспериментальная часть		114
4.1	Материалы	114
4.2	Методика получения комплексов пектина с НПВС	114
4.2.1	Методика получения комплексов пектина с ибупрофеном	114
4.2.2	Методика получения комплексов пектина с аспирином	116
4.3.	Методика получения комплексов полигалактуроната натрия с противомикробными препаратами	118
4.3.1	Методика получения комплексов полигалактуроната натрия с гидрохлоридом тетрациклина	118
4.3.2	Методика получения комплексов полигалактуроната натрия с амоксициллином	122
4.4	Методы физико-химического анализа пектина и комплексов на его основе	123
4.4.1	ИК спектроскопия	123
4.4.2	УФ спектроскопия	124
4.4.3	ЯМР спектроскопия	124

4.4.4 Рентгеновская порошковая дифрактометрия	124
4.4.5 Динамическое рассеяние света	124
4.4.6 Сканирующая электронная микроскопия	125
4.4.7 Элементный анализ	125
4.4.8 Термогравиметрия, совмещенная с дифференциальной сканирующей калориметрией (ТГ/ДСК)	125
4.5 Исследования биологической активности молекулярных комплексов пектина с НПВС	126
4.5.1 Исследования биологической активности молекулярных комплексов пектина с ибупрофеном	126
4.5.2 Исследования биологической активности молекулярных комплексов пектина с ацетилсалициловой кислотой	130
4.6 Исследования биологической активности комплексов полигалактуроната натрия с противомикробными препаратами	131
4.6.1 Исследования биологической активности молекулярных комплексов полигалактуроната натрия с тетрациклином	131
4.6.2 Исследования биологической активности молекулярных комплексов полигалактуроната натрия с амоксициллином	133
Заключение	135
Список сокращений	137
Список литературы	138
ПРИЛОЖЕНИЯ	153
Приложение 1	153
Приложение 2	165
Приложение 3	177
Приложение 4	181
Приложение 5	185
Приложение 6	189

Приложение 7	193
Приложение 8	194

Введение

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Создание лекарственных препаратов с контролируемым высвобождением – одно из актуальных и интенсивно развивающихся направлений науки на стыке фармацевтической химии и фармакогнозии. Это обусловлено необходимостью контроля высвобождения действующих веществ из готовой лекарственной формы с целью обеспечения биодоступности, пролонгированности действия и уменьшения (устранения) побочных эффектов лекарственного средства. Существующие методы контроля высвобождения активного вещества из готовой лекарственной формы можно подразделить на физические (гранулирование, коатирование) и химические. К числу последних относятся перевод активной молекулы в заряженную или нейтральную форму, а также ее иммобилизация в комплексах включения или на полимерных матрицах. Последний метод является наиболее перспективным, поскольку позволяет надежно изменить параметры фармакокинетики действующего вещества в широком интервале. Наибольшее распространение получили комплексы на основе низкомолекулярных лекарственных средств и синтетических полимеров (поливинилпирролидон, полиакриловая кислота, полиметилакриловая кислота и др.). Значительно реже в качестве матрицы для иммобилизации действующих веществ используются природные полимеры, в частности пектины. Пектины - биополимеры полиуронидной природы, образованные остатками полигалактуроновой кислоты, которые соединены между собой α -(1-4)-гликозидными связями, при этом часть карбоксильных групп в них метилированы [1,2]. Пектины обладают широким спектром биологической активности: иммуномодулирующей, противовоспалительной, противоопухолевой, противогликемической и т.д. [3]. Одним из направлений химической модификации пектинов является их способность к реакциям соле- и комплексообразования, позволяющая создавать трехмерные структуры, отдельные элементы которых связаны друг с другом с помощью ионных и ковалентных связей [4]. Вместе с тем, в литературе представлено небольшое количество публикаций, посвященных использованию пектиновых полисахаридов для иммобилизации лекарственных средств, таких как метронидазол [5], ацеклофенак [6] и др.

В качестве объектов исследования нами были выбраны два класса лекарственных средств – нестероидные противовоспалительные препараты и антимикробные средства.

Выбор данных классов соединений обусловлен в первую очередь их широкой распространенностью. Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) обладают противовоспалительным, анальгезирующим и жаропонижающим эффектами и приносят облегчение больным с симптомами воспаления, боли, лихорадки, которые отмечаются при многих заболеваниях. Однако НПВС оказывают побочное действие на желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), вызывая диспепсию, боли в животе, образование язв и эрозий желудка и двенадцатиперстной кишки, увеличивая риск перфорации язвы и желудочно-кишечное кровотечение, а также поражают нижние отделы ЖКТ – тонкого и толстого кишечника – более чем у 30% пациентов [7,8].

Противомикробные препараты - продукты жизнедеятельности (или их синтетические аналоги и гомологи) живых клеток (бактериальных, грибковых, растительного и животного происхождения) - избирательно подавляют функционирование других клеток – микроорганизмов, опухолевых клеток и т.д. Они проявляют высокую избирательность и активность по отношению к микроорганизмам, однако при этом вызывают ряд побочных эффектов: аллергические реакции (в том числе анафилактический шок), суперинфекции (дисбактериоз, ослабление иммунитета) и токсические явления (диспепсию, флебиты, нарушения функции печени и почек и др.) [8].

Таким образом, создание новых лекарственных форм пролонгированного действия с контролируемым высвобождением на основе пектина – природного полисахарида – является важным и актуальным. Это позволит обеспечить водорастворимость (биодоступность) и уменьшить побочные эффекты используемых лекарственных средств.

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования стало установление общих закономерностей комплексообразования цитрусового пектина с рядом нестероидных противовоспалительных препаратов (ацетилсалициловая кислота и ибупрофен) и некоторыми противомикробными препаратами (тетрациклин и амоксициллин), исследование физико-химических свойств полученных комплексов для создания новых лекарственных средств с контролируемым высвобождением, характеризующихся высокой биологической активностью и водорастворимостью, пролонгированным действием и пониженным ulcerогенным эффектом.

Для достижения поставленной цели нами были решены следующие **задачи**:

1. Разработка рациональных методов синтеза комплексов пектина с НПВС (ацетилсалициловая кислота и ибупрофен);
2. Исследование физико-химических характеристик и структурных особенностей полученных комплексов пектина с НПВС;
3. Изучение биологической активности комплексов пектина с НПВС;
4. Разработка рациональных методов синтеза комплексов пектина с противомикробными препаратами (тетрациклин и амоксициллин);
5. Исследование физико-химических характеристик и структурных особенностей полученных комплексов пектина с противомикробными препаратами (тетрациклин и амоксициллин);
6. Изучение антимикробной активности комплексов пектина с противомикробными препаратами (тетрациклин и амоксициллин);
7. Выявление закономерности типа «структура-свойство» целевых комплексов и провести оценка их эффективности.
8. Установление норм качества и стандартизация фармацевтических субстанций: комплекса пектина с ибупрофеном П/ИБП 6 и комплекса пектата натрия с тетрациклином ПГNa/ТС 5.

Научная новизна работы состоит в следующем:

1. Впервые показано, что взаимодействие пектина с нестероидным противовоспалительным препаратом ибупрофен протекает с образованием устойчивых водорастворимых комплексов, при этом установлено оптимальное соотношение пектин: ибупрофен (5.7:1 масс.) и максимальное количество ибупрофена, связанного в комплекс (15%). Оптимизированы условия получения комплексов пектина с ацетилсалициловой кислотой (4:1 масс.), определена их стехиометрия и установлено максимальное количество АСК, связанной в комплекс (16%).
2. Найдено, что взаимодействие пектата натрия с гидрохлоридом тетрациклина или гидрохлоридом амоксициллина протекает с образованием устойчивых водорастворимых комплексов с максимальным содержанием 6.7% тетрациклина или 8.0% амоксициллина.
3. Проведено исследование свойств комплексов пектина с нестероидными противовоспалительными и противомикробными препаратами с использованием физико-химических методов анализа (^{13}C ЯМР-, ИК-, УФ- спектроскопия,

термогравиметрический анализ, совмещенный с дифференциальной сканирующей калориметрией, рентгеновская порошковая дифрактометрия, динамическое светорассеяние, электронная микроскопия), что позволило подтвердить образование устойчивых комплексов. Показано, что наиболее информативными методами изучения свойств комплексов являются рентгеновская порошковая дифрактометрия и термогравиметрический анализ. В частности, методом порошковой рентгеновской дифракции установлено, что в комплексах имеет место гомогенное распределение лекарственных средств с отсутствием выделения последних в исходную кристаллическую фазу. Исследование термостабильности комплексов, проведенное методом термогравиметрии, показало, что все использованные в работе низкомолекулярные лекарственные средства имеют одну стадию потери массы, связанную с их разложением. В свою очередь, пектин и комплексы на его основе имеют несколько стадий потери массы, обусловленных термическим разложением полимерного остова с выделением H_2O и CO_2 в качестве основных компонентов.

4. Впервые изучена противовоспалительная активность комплексов пектина с ибупрофеном и ацетилсалициловой кислотой на моделях *in vivo*. Показано, что активность комплексов с ибупрофеном и ацетилсалициловой кислотой выше, чем у исходных лекарственных препаратов. При этом ульцерогенное воздействие на слизистую желудка в группе крыс, получавших комплекс ибупрофена и пектина, проявилось в меньшей степени, чем у животных, получавших чистый ибупрофен.

5. Показано, что антимикробная активность комплексов пектина с тетрациклином сопоставима с активностью чистого препарата тетрациклина в отношении всех тест-микроорганизмов (*E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*), в то время как МБК комплексов по отношению к *S. aureus* в 2 раза выше по сравнению с чистым тетрациклином.

6. Впервые исследована фармакокинетика комплексов пектина с ибупрофеном и тетрациклином. Установлен пролонгированный характер высвобождения лекарственного препарата из комплекса в плазме крови лабораторных животных (крысы).

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработаны условия синтеза комплексов на основе пектина с НПВС и антибиотиками. Полученные результаты являются научной основой для создания новых лекарственных средств,

характеризующихся высокой биологической активностью и биодоступностью, пролонгированным действием и пониженным ulcerогенным эффектом.

На примере комплексов пектина с ибупрофеном и тетрациклином выявлены параметры качества, определяющие их эффективность и безопасность фармацевтических субстанций, проведена стандартизация фармацевтических субстанций: комплекса пектина с ибупрофеном П/ИБП 6» и комплекса пектата натрия с тетрациклином ПГNa/ТС 5».

Методы и методология диссертационного исследования. Результаты работы получены по итогам исследования закономерностей комплексообразования пектиновых полисахаридов с НПВС (ацетилсалициловая кислота и ибупрофен) и противомикробными препаратами (тетрациклин и амоксициллин). В рамках проведенного исследования использован широкий набор современных физико-химических методов анализа (^{13}C ЯМР-, ИК-, УФ- спектроскопия; рентгеновская порошковая дифрактометрия, термогравиметрия с дифференциальной сканирующей калориметрией, изучение элементного состава, сканирующая электронная микроскопия, динамическое светорассеяние).

Положения, выносимые на защиту:

1. Методы синтеза комплексов цитрусового пектина с НПВС (ацетилсалициловая кислота и ибупрофен) и с противомикробными препаратами (тетрациклин и амоксициллин);
2. Закономерности комплексообразования цитрусового пектина с НПВС (ацетилсалициловая кислота и ибупрофен) и противомикробными препаратами (тетрациклин и амоксициллин); оптимальные условия их получения и физико-химические свойства полученных комплексных соединений;
3. Оценка противовоспалительной активности и ulcerогенного действия комплексов П/АСК и П/ИБП;
4. Оценка противомикробной активности комплексов ПГNa/ТС и ПГNa/АХ.
5. Нормы качества, методы для контроля качества и стандартизация фармацевтических субстанций: комплекса пектина с ибупрофеном П/ИБП 6 и комплекса пектата натрия с тетрациклином ПГNa/ТС 5.

Достоверность результатов работы и обоснованность положений, выносимых на защиту, обеспечена высоким методическим уровнем проведения работы, применением современных инструментальных методов исследования, воспроизводимостью экспериментальных данных, соотнесением полученных результатов с известными результатами теории и эксперимента, использованием количественных критериев при сравнении различных результатов, статистической обработкой результатов и достоверностью различий групп данных, в частности, для биологических экспериментов.

Личный вклад автора состоит в участии в постановке цели и задач исследования, анализе и обобщении литературных данных по тематике работы, планировании и проведении экспериментальных исследований, обсуждении полученных результатов и формулировке выводов, подготовке публикаций по теме исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (химические науки) по п. 1. «Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ» и п. 2. «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств».

Апробация работы. Основные результаты исследований, выполненных в рамках диссертационной работы, были представлены на всероссийских и международных конференциях (XXII Всероссийская конференция молодых учёных-химиков (с международным участием), Нижний Новгород, 2019 г; XI Всероссийская научная конференция с международным участием и школой молодых ученых «Химия и технология растительных веществ», Сыктывкар, 2019 г; Markovnikov Congress on Organic Chemistry, Moscow-Kazan, 2019; XXI Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry, Saint Petersburg, 2019; 53rd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation «The Clocks of Metabolism and Disease», Coimbra, Portugal, 2019; XII Международная научно-практическая конференция, Сочи, 2020; Международная научная экологическая конференция «Аграрные ландшафты, их устойчивость и

особенности развития», Краснодар, 2020; XXIV Всероссийская конференция молодых учёных-химиков (с международным участием), Нижний Новгород, 2021; Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные проблемы органической химии», Новосибирск, 2021; XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «Mendeleev 2021», 2021; XXV Всероссийская конференция молодых учёных-химиков (с международным участием), Нижний Новгород, 2022; 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021», Волгоград, 2022.

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 15 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, и 10 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 194 страницах машинописного текста, включает введение, литературный обзор, обсуждение результатов, показатели норм качества полученных соединений, экспериментальную часть, выводы, список использованных библиографических источников, включающий 113 наименований, и приложения.

Во **Введении** обоснована актуальность выбранной темы исследования, определена цель и сформулированы задачи для ее достижения, изложены научная новизна, практическая значимость работы и положения, выносимые на защиту.

Первая глава (обзор литературы) посвящена пектиновым полисахаридам, их структуре, свойствам, методам получения, химической модификации. В литературном обзоре рассмотрены основные характеристики нестероидных противовоспалительных средств и противомикробных препаратов, а также приведен анализ исследований их взаимодействия с различными олиго- и полисахаридами.

Вторая глава (результаты и их обсуждение) посвящена анализу и обсуждению полученных в рамках диссертационной работы экспериментальных результатов. В **Части 2.1** представлены данные по комплексообразованию пектина с нестероидными противовоспалительными препаратами (ацетилсалициловая кислота и ибупрофен), приведены физико-химические характеристики полученных комплексов и результаты биологических исследований. **Часть 2.2** посвящена взаимодействию полигалактуроната

натрия с противомикробными препаратами (тетрациклин и амоксициллин) при варьировании концентрации последних, а также высвобождению ЛС из комплексов.

В третьей главе (показатели норм качества полученных соединений) обсуждены методы подтверждения подлинности и количественного определения фармацевтических субстанций П/ИБП 6 и ПГNa/ТС 5, а также результаты испытаний на микробиологическую чистоту полученных соединений.

В четвертой главе (экспериментальная часть) приведены характеристики реактивов и оборудования, используемых в работе, описаны методы и условия синтеза целевых продуктов, а также методы определения их физико-химических характеристик и биологических свойств.

Работа выполнена в технологической лаборатории Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова - обособленного структурного подразделения федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук». Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-33-90222 «Аспиранты»).

Автор выражает благодарность своему научному руководителю, доценту, д.х.н. Милюкову В.А. за чуткое руководство и неоценимую помощь при выборе темы диссертационной работы, постановке задач и интерпретации полученных результатов; Минзановой Салиме Тахиятулловне за безграничную поддержку и помощь в обсуждении результатов.

ГЛАВА 1. Пектиновые полисахариды и лекарственные средства на их основе (литературный обзор)

1.1 Пектиновые полисахариды: структура, физико-химические свойства, биологическая активность

1.1.1 Структура и получение пектиновых полисахаридов

Термин «пектин» охватывает разнообразную группу полисахаридов, присутствующих в первичных клеточных стенках и срединных пластинках растений. Основным сахарным остатком, из которого состоит большинство пектинов, является D-галактуроновая кислота, представленная в виде α -(1-4)-связанной линейной цепи, в которой определенная доля карбоксильных групп этерифицирована метанолом. В коммерчески доступном пектине содержание галактуроновой кислоты обычно превышает 75%, тогда как степень этерификации может варьироваться от 30 до 80%. Чтобы контролировать реологические и физические характеристики пектина, когда он используется в качестве пищевого ингредиента, его часто модифицируют путем амидирования, в результате чего при атоме С-6 группа OCH_3 заменяется на NH_2 -группу. Когда речь идет о пектинах в растительных материалах, термин «пектиновые вещества» используется для обозначения рамногалактурановых сегментов в молекуле пектина, ассоциированных с нейтральными сахарными боковыми цепями арабианов, галактанов и арабиногалактанов.

Пектины были открыты в 1790 г., когда французский химик Луи-Николя Воклен выделил из яблок вещество, образующее в водном растворе студень. Термин «пектин» был введен в 1825 г. Бракноном. Исторически сложилось деление пектинов на растворимые (гидропектин) и нерастворимые (протопектин) [9].

Структурные элементы пектинов в основном включают в себя гомогалактуран, рамногалактуран-I, рамногалактуран-II и ксилогалактуран (рисунок 1). Относительные количества и химическая структура различных элементов в молекуле пектина, вероятно, зависят от происхождения и стадии развития растительного материала, а также от функции клеточной стенки, из которой происходит извлечение пектиновых полисахаридов. Показано, что для определенных тканей некоторые структурные элементы вообще отсутствуют. Например, в то время как

гомогалактуроновые элементы отсутствуют в клеточных стенках сои, ксилогалактуронаны присутствуют в ней в избытке [10;11; 12].

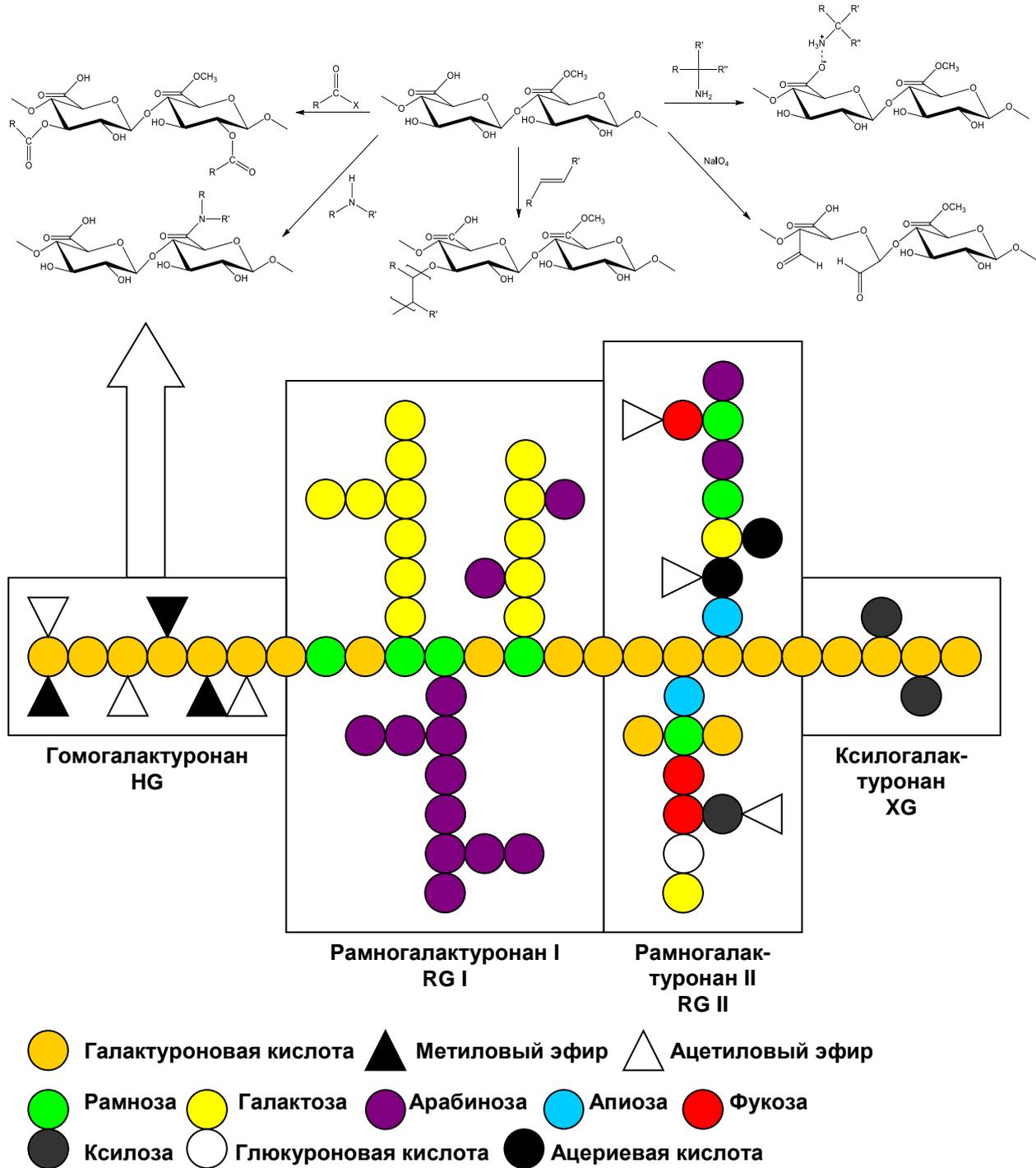


Рисунок 1 – Типичная модель первичной структуры пектинов, содержащая в качестве основы «гладкие участки» - гомогалактуронан (некоторые из карбоксильных групп мономерных звеньев которого являются метилированными или ацетилованными), прерываемые «волосатыми участками», состоящими из RG-I, RG-II и ксилогалактуронана

Основные структурные различия между различными коммерчески доступными пектинами (в основном гомогалактуронанов) и различия в функциональности сегментов гомогалактуронана в тканях растений объясняются содержанием метиловых эфиров, присутствующих в положении С-6 остатков галактуронової кислоты и распределение этих сложных эфиров по галактуронової цепи. Обычно степень этерификации (СЭ) выражают в количестве молей метанола на 100 молей галактуронової кислоты. Когда СЭ составляет 50 или выше, пектины называются высокометоксилированными, тогда как низкометоксилированные пектины имеют СЭ < 50. Это разделение очень поверхностное, поскольку распределение метилового эфира может варьироваться как на внутримолекулярном уровне (в пределах одной молекулы), так и на межмолекулярном уровне (по различным молекулам пектина в смеси). Как следствие, распределение метиловых эфиров по основной цепи галактуронана может значительно различаться, что приводит к различному поведению разных молекул пектина. Внутри одной молекулы распределение сложноэфирных групп может варьироваться от случайного распределения, при котором все сложные эфиры «разбросаны» по полимеру, до блочного распределения, при котором длинные участки неэтерифицированных остатков галактуронової кислоты чередуются с сегментами, почти полностью метилэтерифицированными. Поскольку считается, что в растительном сырье гомогалактуронаны синтезируются полностью метилэтерифицированными, распределение, обнаруживаемое в конкретных пектинах, будет зависеть от действия эндогенных ферментов растений, таких как пектинметилэстеразы (которые могут вызывать блочное распределение), или от условий, в которых сырье обрабатывается при экстракции пектина.

Рамногалактуронан – общее название для богатых рамнозой и галактуронової кислотой областей молекул пектина, которые состоят в основном из повторяющихся звеньев чередующихся α -(1-2)-связанных остатков рамнозы и α -(1-4)-связанных остатков галактуронової кислоты. Такие области чередующихся остатков рамнозы и галактуронової кислоты, выделенные из культивируемых в суспензии клеток платана, имеют длину 100-300 мономерных звеньев и были названы рамногалактуронаном-I (RG-I). Считается, что размер остова RG-I зависит от растительной ткани и условий окружающей среды. Рамногалактуронаны, полученные после обширной деградации ферментами, разлагающими гомогалактуронан, часто состоят из неравных количеств

рамнозы и галактуронозой кислоты (отношение рамнозы к галактуронозой кислоте колеблется от 0.05:1 до 1:1).

В 1980-х годах группа Альбершайма описала наличие сильно замещенных рамногалактуронозных участков (состоящих из чередующихся фрагментов рамнозы и галактуронозой кислоты), несущих боковые цепи, в основном, из остатков арабинозы и галактозы. Этот рамногалактуронан-I высвобождается после энзимолиза культивируемых клеток платана смесью ферментов, разлагающих пектин. После ферментативной деградации галактуронанового остова пектинов были проанализированы полученные полимерные фрагменты, и было установлено, что отношение содержания уроновых кислот к нейтральным сахарам различается. Эти неразложившиеся части гомогалактуронозных сегментов, связанные с одним или несколькими рамногалактуронозными элементами, были дополнительно фракционированы с помощью эксклюзионной (гель-проникающей) хроматографии, и был сделан вывод, что пектин организован более регулярно, чем ожидалось. Нейтральные сахара в пектинах сконцентрированы в блоках сильно замещенных рамногалактуронановых («волосатых – hairy») [13 ; 14 ; 15] областей, в которых присутствует лишь относительно небольшая часть уроновых кислот. Эти «волосатые» области разделены «гладкими» областями, состоящими только из D-остатков галактуронозой кислоты. Соотношение «гладких» и «волосатых» областей может сильно различаться в зависимости от источника пектина.

Принимая во внимание все возможные вариации, можно констатировать, что рамногалактуронаны представляют собой семейство сложных структур. Это дополнительно подчеркивается тем фактом, что у различных боковых цепей общим является только рамногалактуронановый остов. Такая сложная природа замещения отдельных сахарных остатков считается не случайным образом распределенной по рамногалактуронановой цепи.

Рамногалактуронан-II или высокоразветвленный галактуронан (RG-II) был впервые идентифицирован после выделения из суспензии культивируемых клеток платана. Он состоит из скелета, в основе которого находятся около девяти α -(1-4)-связанных остатков галактуронозой кислоты, несущих четыре боковые цепи, содержащие ряд сахаров. Впоследствии RG-II был обнаружен во многих других растительных тканях и, по-видимому, он имеет достаточно консервативную структуру.

Используя специфические ферменты, способные гидролизовать рамногалактуронан, было установлено, что существуют сильно разветвленные блоки с длинными нейтральными боковыми цепями сахара в дополнение к сегментам из 30 остатков чередующихся последовательностей рамнозы и галактуроновой кислоты, в которых некоторые остатки рамнозы несут единичную замену галактозы. Доступность ферментов, способных гидролизовать рамногалактуронан (гидролазы и лиазы), привела к открытию других структурных элементов пектина, таких как ксилогалактуронан. На яблочном пектиновом материале была выделена ксилогалактуронановая область, состоящая из линейного гомогалактуронана с однозвенными заместителями ксилозы, связанными с О-3 частью фрагментов галактуроновой кислоты. Количество и распределение метиловых эфиров, присутствующих в сегменте ксилогалактуронана, может значительно различаться в зависимости от исходного сырья. Кроме того, было описано присутствие небольших количеств фукозы в ксилогалактуронанах, в то время как в литературе отмечается присутствие более одного остатка ксилозы в боковых цепях ксилогалактуронана гороха [1, 2].

Методы получения пектиновых полисахаридов. Пектин получают в основном из фруктов, в частности, из побочных продуктов их переработки (кожуры или жома). Экстракция пектина представляет собой непрерывный процесс, состоящий из гидролиза пектина в растительной ткани и его выделения в водную фазу. Для извлечения пектина было разработано несколько методов: кислотная, щелочная и ферментативная экстракция. Для повышения выхода и/или уменьшения времени извлечения пектина вместо данных методов могут быть использованы субкритическая экстракция, микроволновое или ультразвуковое облучение либо комбинация вышеперечисленных методов.

Химическая обработка растительного сырья с использованием неорганических кислот в качестве катализаторов является наиболее распространенным методом. Для экстракции пектина обычно используют сильные неорганические кислоты, такие как азотная, серная или соляная кислота. Однако использование сильных минеральных кислот может привести к образованию производных, способных нанести ущерб здоровью и окружающей среде. Эти загрязняющие вещества могут входить в состав пектиновых экстрактов, что делает необходимой стадию очистки, и неизбежно ведет к увеличению стоимости процесса. По этой причине органические кислоты, такие как

уксусная, аскорбиновая или лимонная кислоты, являются альтернативой, позволяющей избежать образования токсичных химических веществ и, следовательно, сделать процесс экологически безопасным. Кроме того, высвобождение пектина под действием органических кислот происходит медленнее по сравнению с неорганическими кислотами из-за более низкой способности кислот протонировать пектин в водных растворах. По этой причине необходимо более длительное время инкубации для получения таких же выходов, как и при использовании традиционных методов. Во избежание такого большого времени обработки, необходимо повысить температуру реакции, что еще больше разрушает клеточную стенку, способствуя диффузии кислоты и высвобождению пектина из клеточной стенки растений [16;17;18].

Пектин из фруктов также можно экстрагировать растворами щелочей. Гидроксид-ионы в щелочных растворах вызывают набухание клеточной стенки, разрушая поперечно-сшитые структуры целлюлозы и гемицеллюлозы. Щелочная экстракция вызывает повышенный интерес, так как она способна сохранить область RG-I [19] с нейтральными сахарными боковыми цепями пектина, тем самым производя низкометоксилированный пектин с хорошей способностью связывать ионы [20], но деполимеризует основную цепь за счет β -элиминирования [21].

Ферментативную экстракцию обычно проводят при пониженной по сравнению с кислотной либо щелочной экстракцией температуре (35-60°C). Ферменты разрушают клеточную стенку растения путем гидролиза целлюлозы или гемицеллюлозы, тем самым высвобождая пектин, захваченный сложной сетью целлюлозы/гемицеллюлозы. Наиболее часто используемыми ферментами в процессах экстракции пектина являются целлюлаза, протопектиназа, гемицеллюлаза и ксиланаза. Ферментативная экстракция дает важные преимущества при извлечении пектина из растительных пищевых материалов, отходов и побочных продуктов. Этот метод может увеличить выход пектина по сравнению с традиционными процессами и может использоваться при низких температурах процесса, что снижает потребление энергии. Ее также можно комбинировать с традиционной экстракцией химическим растворителем, что требует меньшего количества растворителя и сокращает время экстракции в полном соответствии с подходами к «зеленой» экстракции. Кроме того, мягкие условия исключают коррозию оборудования, которая часто наблюдается при использовании высоких температур для целей экстракции [22;23].

Также возможно использование неконвенциональных методов извлечения пектиновых полисахаридов из клеточной стенки. Субкритическая экстракция – способ извлечения пектиновых веществ из растительного сырья с использованием субкритической воды. Данный метод является относительно новым и «зеленым» способом извлечения пектинов из растительного сырья, который в последнее время привлекает все больше внимания. Субкритическая вода представляет собой воду, способную существовать в жидкой фазе при температуре больше 100°C за счет увеличения давления до более высокого уровня. При этом температура системы является преобладающим фактором, определяющим выход пектина. Увеличение выхода пектина по сравнению с классическими методами связано с ослаблением межмолекулярных водородных связей, что приводит к снижению диэлектрической проницаемости и уменьшению полярности воды. Это, в свою очередь, снижает энергию, необходимую для нарушения взаимодействия растворенного вещества с матрицей, и увеличивает выход пектина, однако требует использования специальных установок для поддержания повышенного давления в системе [24;25;26].

Ультразвуковая экстракция – это нетермический процесс, в котором акустическая энергия используется для увеличения скорости высвобождения и диффузии целевых материалов за счет кавитации растворителя. Кавитация во время экстракции с помощью ультразвука разрушает растительную клетку, способствуя извлечению пектина с лучшими химическими и функциональными свойствами. Это связано с тем, что ультразвуковые волны могут увеличивать контактную поверхность, поэтому большее количество растворителя может проникнуть в материалы для извлечения пектина [27;28;29].

Экстракция с помощью микроволн протекает благодаря использованию неионизирующего излучения, которое создает температурный градиент между твердыми частицами и растворителем, что приводит к более быстрому и эффективному извлечению. Это приводит к быстрому нагреву клеточной стенки растительного сырья. Тепло ускоряет массоперенос и помогает разрушить сложную сеть пектин/целлюлоза/гемицеллюлоза, тем самым способствуя высвобождению пектина. На выход микроволновой экстракции влияют как мощность, так и время облучения. По сравнению с традиционными методами, микроволновая экстракция обеспечивает более

равномерное распределение температуры и позволяет получать пектин с более высоким выходом за более короткое время [22;30].

Экстракция с одновременным использованием микроволнового излучения и ультразвука – новый метод для извлечения пектина, который уменьшает либо полностью предотвращает деградацию пектина и повышает эффективность экстракции. Кавитация, вызванная ультразвуком, разрушает клеточные стенки и усиливает массоперенос пектина, в то время как микроволновое облучение равномерно повышает температуру системы и ускоряет разрыв клеточных стенок. Сочетание этих эффектов совместно разрушает сложные сети из пектина, целлюлозы и гемицеллюлозы, способствуя высвобождению пектина из клеточных стенок плодов. Поэтому экстракция с помощью ультразвука и микроволн обеспечивает быструю и эффективную экстракцию пектина при низких температурах, экономит энергию и снижает затраты. Вместе с тем, создание оборудования, способного одновременно воздействовать на сырье с помощью ультразвуковых и микроволновых волн при постоянном перемешивании смеси, является крайне сложным процессом, в результате чего на сегодняшний день данный метод все еще находится на стадии экспериментальной разработки [31;32;33].

1.1.2 Биологическая активность пектиновых полисахаридов

Пектиновые полисахариды являются биологически активными веществами. В частности, они проявляют иммуномодулирующие, противовоспалительные, противораковые, антиоксидантные, антибактериальные и гипогликемические свойства [3; 34 ; 35 ; 36]. В литературе известно большое количество работ, посвященных биологической активности пектинов.

Так, полисахариды, полученные из кожуры апельсина при использовании в качестве экстрагента салициловой кислоты, состоят из 56.7% арабинозы, 17.8% галактозы, 13.8% ксилозы, 5.1% рамнозы, 2.5% маннозы и 1.5% глюкозы. Подобное массовое распределение моносахаридов в структуре полученного продукта позволяет установить наличие в его составе пектина со степенью этерификации 50.9% [18].

Полученный пектин может быть очень эффективным в предотвращении образования карциномы толстой кишки (Caco-2) с максимальной степенью ингибирования 93.05% при концентрации 10 мкг/мл и IC_{50} 1.4 мкг/мл. Следовательно,

полученный пектин может иметь потенциальные терапевтические эффекты и может использоваться в качестве адьюванта при лечении рака толстой кишки. Полученные результаты также свидетельствуют о том, что пектин может дозозависимым образом ингибировать развитие эпителиальных клеток рака печени (Hep-2) с максимальной скоростью 83.17% при концентрации 10 мкг/мл и IC_{50} 1.8 мкг/мл. Значительная антипролиферативная активность пектина в отношении клеток Caco-2 и Hep-2, вероятно, связана с высоким содержанием галактуроновой кислоты в полисахариде (62.75%) [18].

Воспаление является основным фактором риска различных прогрессирующих заболеваний у людей, включая рак, неврологические заболевания, нарушения обмена веществ и сердечно-сосудистые заболевания. Патология воспаления представляет собой сложный процесс, запускаемый микробными возбудителями, такими как вирусы, бактерии, прионы и грибы. Макрофаги составляют первую линию защиты человеческого организма. Липополисахарид (ЛПС) обычно используется в качестве модели воспаления из-за его способности стимулировать макрофаги. Макрофагами, индуцированными ЛПС, секретируются различные медиаторы воспаления: цитокины, такие как фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), интерлейкин-1 β (IL-1 β) и оксид азота (NO). Индуцированный ЛПС RAW 264.7 (клеточные линии мышинных макрофагов) обычно используется в качестве модели для скрининга кандидатов на противовоспалительные средства *in vitro* [3].

Крайне эффективной стратегией предотвращения воспалительных процессов является употребление пищевых волокон, в частности, пектинов. В частности, возможно использование пектинов как единственного средства для лечения воспаления, так и в качестве матрицы для доставки противовоспалительных препаратов, что приведет к возникновению синергетического эффекта и более быстрому излечению. Модифицированные цитрусовые пектины (МЦП) были получены путем окисления перекисью водорода под действием ультрафиолетового излучения как в щелочных (pH 10, МЦП 10), так и в кислых условиях (pH 4, МЦП 4). Очищенные МЦП обладают различными структурными особенностями и биологической активностью. Дегградация пектиновых полимерных цепей при pH 10 способствует деметоксилированию и гидролизу основной цепи гомогалактуронана посредством атаки свободных радикалов с образованием МЦП 10, состоящего из короткого отрезка гомогалактуронана с низким

уровнем степени метоксилирования и области, обогащенной RG-I, с галактанами и арабиногалактанами, сильно разветвленными до остатка рамнозы. β -элиминирование на пектине также приводило к образованию некоторых ненасыщенных производных галактуроновой кислоты в МЦП 10 посредством конкурентного механизма против процесса метоксилирования. Однако деметоксилирование при pH 4 было незначительным, в то время как преобладал кислотный гидролиз боковых цепей полисахарида. Это привело к МЦП 4 с линейной структурой, состоящей из обогащенной части гомогалактуронана с высокой степенью метоксилирования и меньшей области RG-I с ответвлениями с низким содержанием нейтральных сахаров. МЦП 10 проявил более высокую противовоспалительную активность, чем МЦП 4, в подавлении экспрессии NF- κ B и продукции провоспалительных факторов TNF- α и IL-1 β клетками THP-1, стимулируемыми липополисахаридом. МЦП 10 также показал более сильное ингибирующее действие на пролиферацию клеток Caco-2. Более сильная биоактивность МЦП 10 может быть связана с многочисленными ответвлениями и достаточной длиной терминальных остатков галактана, присоединенных к домену RG-I [37].

Два новых пектиновых полисахарида, извлеченные из кожуры плодов маракуйи (*Passiflora edulia Sims*) путем экстракции горячей водой и экстракции с помощью ультразвука, в основном включают галактуроновую кислоту, глюкозу, ксилозу, арабинозу, галактозу и рамнозу. Активность полученных пектинов по удалению радикалов DPPH, ABTS, гидроксильных радикалов и супероксидных анионов повышалась дозозависимым образом. В макрофагах RAW 264.7, индуцированных липополисахаридами, пектины могут ингибировать секрецию провоспалительных факторов (NO, IL-1 β , TNF- α и IL-6) и снижать экспрессию генов. Однако полисахарид, извлеченный с помощью ультразвука, показал более сильную антиоксидантную и противовоспалительную активность. Результаты исследований показали, что обработка ультразвуком может быть эффективным подходом к получению полисахаридов пектина с более низкой молекулярной массой и более сильной антиоксидантной и противовоспалительной активностью [38].

Кислоторастворимые пектины из бамии также способны проявлять антиоксидантное и противовоспалительное действие [39]. В частности, были получены две кислоторастворимые фракции пектина бамии, а именно кислоторастворимый пектин-сырец бамии (CAOP) и депротеинизированный кислоторастворимый пектин

бамии (АОР), которые демонстрировали структурные и композиционные различия. Две пектиновые фракции имели низкую степень этерификации (42.0–46.5%) и относительно высокое содержание уроновой кислоты (31.6–37.3%). АОР состоял из галактуроновой кислоты (79.1 моль/%), галактозы (4.3 моль/%), рамнозы (14.5 моль/%) и ксилозы (2.1 моль/%), а молекулярная масса составляла 92.8 кДа. Исследованы также морфологические и термические свойства кислоторастворимых компонентов пектина бамии. По сравнению с САОР, АОР проявлял лучшую антиоксидантную активность и подавлял продукцию NO в ЛПС-индуцированных макрофагах RAW 264.7. Все приведенные выше результаты показали, что АОР может действовать как природный антиоксидант или функциональное противовоспалительное питание, что расширит возможности развития и использования ресурсов бамии [39].

Пектин из плодов малины был получен кислотным и ферментативным методами и очищен путем ступенчатого осаждения этанолом и выделения с помощью ионообменной хроматографии [40]. Полученный энзимолитом пектин малины имел относительно интактную структуру с молекулярной массой 50 кДа и степенью метоксилирования 39%. Анализ 1D/2D ЯМР показал, что полученный пектин представляет собой высокоразветвленный пектин, в основном содержащий 50% гомогалактуронана, 16% разветвленных α -1,5-арабинана и α -1,3-арабинана, 18% β -1,4-галактана и β -1,6-галактана. Пектин малины, экстрагированный лимонной кислотой, содержал меньше арабинана, чем пектин, полученный ферментолитом. Более того, пектин, полученный с помощью ферментативного гидролиза, ингибировал продукцию оксида азота (NO), TNF- α , IL-6 липополисахарид-индуцированными макрофагами на 67%, 22% и 46% в дозе 200 мкг/мл, в то время как степень ингибирования пектина, полученного кислотной экстракцией, составляла 33%, 9% и 1% соответственно. Эти результаты свидетельствуют о том, что малиновый пектин, полученный энзимолитом, содержит больше боковых цепей арабинана и проявляет лучший иммуномодулирующий эффект [40].

Пектиновые полисахариды также способны проявлять антиоксидантную активность. Окислительные повреждения, наносимые гидроксил- и супероксидными радикалами, способны влиять на структуру и физиологические свойства многих биологически активных соединений, в том числе ДНК, и решение проблемы, связанной с защитой ДНК от активных форм кислорода, является актуальной задачей. В работе

[41] влияние ферментативной обработки на физико-химические свойства и антиоксидантную активность натурального пектина боярышника оценивали с использованием ряда характеристических методов. Результаты показали, что четыре модифицированных пектиновых препарата (MPE, MPLE, MPME и MCE, соответственно полученные путем обработки пектиназой, пектинлиазой, пектинметилэстеразой и целлюлазой) показали низкое содержание метоксильных групп в составе пектиновой макромолекулы. MPLE имел самое высокое содержание галактуроновой кислоты (92.01%) и самую высокую температуру разложения (135°C). MPME имел наименьшую молекулярную массу (3.59 кДа), а MCE имел наименьший размер частиц (238.0 нм). Инфракрасная спектроскопия (FTIR) показала, что ферментативная обработка не изменила первичную структуру пектина. Сканирующая электронная микроскопия показала, что четыре модифицированных пектина были более фрагментированы и нерегулярны по сравнению с нативным пектином. Антиоксидантную активность пектиновых препаратов оценивали, определяя их способность поглощать радикалы (гидроксильный радикал и радикал ABTS[•]) и восстанавливающую способность. IC₅₀ для гидроксильного радикала и радикала ABTS[•] всех модифицированных пектиновых препаратов была ниже, чем у исходного пектина. Восстановительная способность MPE и MPME была выше, чем у нативного пектина.

Пектины, полученные из кожуры цитрусовых (ЦП) разных сортов и регионов Китая, сравнивали по физико-химическим свойствам и антиоксидантной активности *in vitro*. Результаты показали, что сорта и районы выращивания оказывают значительное влияние на свойства пектинов, извлеченных из кожуры цитрусовых. Пектины кожуры цитрусовых, экстрагированные уксусной кислотой, представляли собой высокогетерогенные полисахариды с широким распределением молекулярной массы и имели высокое содержание домена RG-I. Среди 10 исследованных видов пектинов кожура цитрусовых *Shatangju* (ЦП-6) и *Xuecheng* (ЦП-7) показала наилучшую антиоксидантную активность, а *Dahongpao* (ЦП-3) и *Buzhihuo* (ЦП-9) – превосходные функциональные свойства (термическую стабильность и вязкость). Согласно корреляционному анализу, молекулярная масса, содержание галактуроновой кислоты и степень этерификации способствовали повышению термостабильности и вязкости пектинов из кожуры цитрусовых, в то время как содержание рамнозы и рамногалактуронана-I и более низкая молекулярная масса могут улучшать

антиоксидантные свойства пектинов из кожуры цитрусовых. Таким образом, ЦП-6 и ЦП-7 могут быть предложены в качестве потенциальных природных антиоксидантов в фармацевтической и косметической промышленности. Между тем, ЦП-3 имеет большой потенциал применения в высокотемпературных пищевых продуктах, а ЦП-9 может использоваться в качестве загустителя или стабилизатора в пищевой промышленности [42].

Влияние структуры пектина на биологические свойства. Стоит отметить, что варьирование структуры пектина, и, как следствие, изменение его степени этерификации, молекулярной массы, содержания рамногалактуронана-I, оказывают влияние на его биологические свойства. Так, было проведено исследование влияние структуры пектинового полисахарида, выделенного из ягод бузины, на его иммуномодулирующую активность [43]. Показано, что нативный пектин, экстрагированный из бузины, состоял в основном из длинных гомогалактуронановых областей в дополнение к рамногалактуроновой цепи, связанной с остатками арабиногалактана-I и арабиногалактана-II. Ферментативная деградация полисахаридов, полученных из ягод бузины, привела к потере остатков арабинозы, и, следовательно, к уменьшению разветвленности боковой цепи, что стало причиной значительного снижения иммуномодулирующей активности по сравнению с исходным пектином. Следовательно, наличие разветвленных цепей арабиногалактана-I и арабиногалактана-II и увеличение их относительного содержания в молекуле пектина приводит к более высокой иммуномодулирующей активности, чем у исходного полимера.

В свою очередь, на антиоксидантную активность пектиновых полисахаридов оказывает содержание свободных гидроксильных и карбоксильных групп [32]. Пектин, выделенный из кожуры инжира, имеет большое содержание урсоловых кислот при сравнительно низкой степени этерификации, в результате чего он продемонстрировал достойную антиоксидантную активность против DPPH[·] и ABTS[·]. Стоит отметить, что большое количество свободных карбоксильных групп в молекуле пектина позволяет ему демонстрировать также сильную антипролиферативную и противоопухолевую активность. Так, было показано, что пектин, выделенный из кожуры инжира, ингибирует рост раковых клеток карциномы печени человека HepG2 и аденокарциномы легкого человека A549. При этом главную роль играет именно наличие большого количества свободных карбоксильных групп.

1.2 Химическая модификация пектиновых полисахаридов и перспективность применения полученных продуктов для медицины

1.2.1 Химическая модификация пектиновых полисахаридов

Наличие большого числа гидроксильных, карбоксильных и метоксилированных карбоксильных групп позволяет пектину образовывать большое количество различных производных [10]. В последние десятилетия химическая модификация пектиновых полисахаридов использовалась для изменения их физико-химических свойств, чтобы улучшить возможности для доставки лекарственных препаратов. Исходя из различных механизмов реакций, затрагивающих отдельные функциональные группы пектинов, способы модификации можно поделить на присоединение (реакции этерификации, эстерификации, амидирования, ацетилирования и т.д.), удлинение цепи (перекрестное сшивание или прививание), деполимеризация (окисление, а также деградация под действием кислот, щелочей или ферментов). Схема некоторых возможных модификаций пектина представлена ниже (рисунок 2).

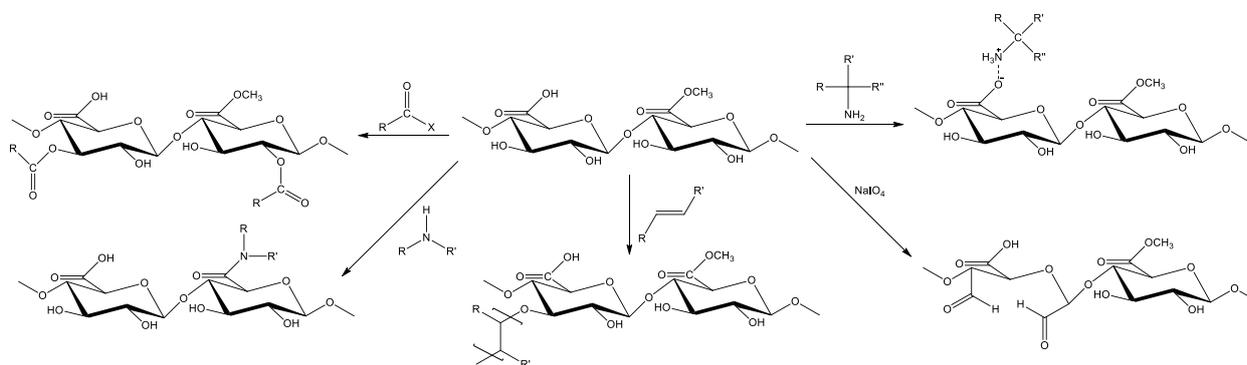


Рисунок 2 – Подходы к модификации пектиновых полисахаридов [10]

Этерификация (образование сложных эфиров). Гидроксильные группы пектинового полисахарида способны реагировать с разнообразными ангидридами и жирными кислотами с образованием сложных эфиров, что приводит к улучшению термостабильности, желирующих и эмульгирующих свойств. Таким образом, этерификация является потенциальной модификацией пектинов для биомедицинских применений, например, для создания систем доставки лекарственных препаратов. Этерификация пектинов обычно протекает под действием ангидридов органических кислот. Стоит учесть, что если в качестве реактива использовать жирные кислоты, то их

перед проведением реакции необходимо превратить в соответствующие ангидриды для увеличения выхода продукта.

Амидирование. Амидированием пектина называется реакция между свободными либо этерифицированными карбоксильными группами молекулы пектина и аминами. Получаемые производные находят широкое применение в фармакологии. Было показано [44], что амидирование и этерификация низкометоксилированного пектина увеличивает степень извлечения связанных ароматических соединений из матрицы гелевого типа по сравнению с исходным низкометоксилированным пектином и пектином, прошедшим этерификацию, но не амидирование. Для создания фармакологических композиций могут использоваться другие полисахариды в сочетании с пектинами. Так, гидрогели на основе амидированного пектина и окисленного хитозана с различным массовым соотношением пектин : хитозан были получены с помощью реакции Шиффа без использования кросс-линкеров [45] (рисунок 3). Гидрогель, содержащий 65% амидированного пектина (по массе), продемонстрировал превосходную способность к набуханию и лучшую биосовместимость среди прочих образцов благодаря большему количеству остаточных аминогрупп в составе гидрогеля. Благодаря этому он имеет большой потенциал для лечения открытых ран кожных покровов.

Окисление. Окисление пектиновых полисахаридов обеспечивает новые подходы к формированию материалов на их основе. Как правило, окисленный пектин используется в комбинации с другими соединениями. Подобная модификация пектина соединяет функциональные группы с его основной цепью. Так, периодатное окисление пектина вводит в его структуру альдегидные группы, способные участвовать в реакции Шиффа. В частности, гидрогели, полученные на основе окисленного пектина, хитозана и $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, продемонстрировали высокие рН- и термочувствительные характеристики, а добавление нанопорошка $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ позволило усилить противораковые свойства гидрогелей без уменьшения их биосовместимости (рисунок 4) [46].

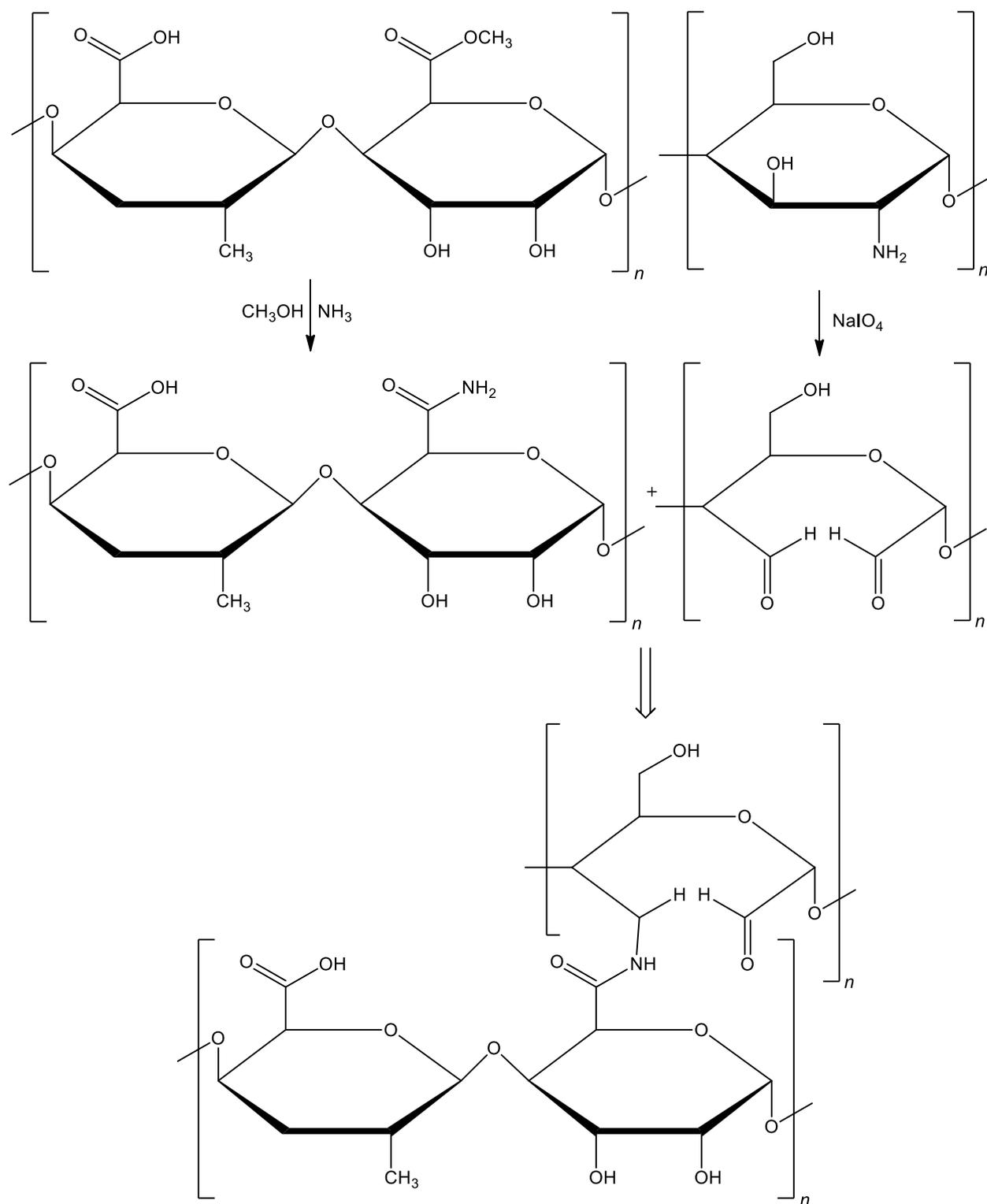


Рисунок 3 – Схема синтеза сшитого гидрогеля на основе амидированного пектина и окисленного хитозана [45]

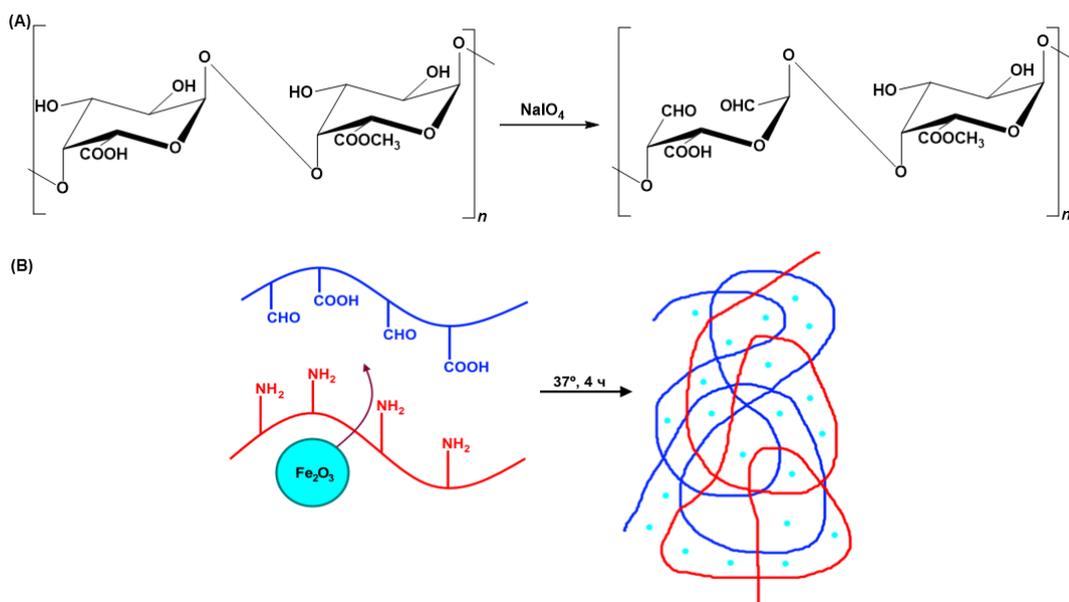


Рисунок 4 – Схема реакции окисления пектинового полисахарида (А) и процесса получения гидрогеля окисленного пектина с хитозаном и γ -Fe₂O₃ (В)

Гидрогелевый скаффолд на основе фиброина шелка и окисленного пектина был использован для доставки антибактериального препарата ванкомицин [47]. Дисконфузионным методом был показан антибактериальный эффект скаффолдов, загруженных ванкомицином, против метициллин-устойчивого стафилококка по сравнению с незагруженными скаффолдами.

Окисленный пектин может также быть использован в качестве кросс-линкера для других полисахаридных матриц. Так, были получены гидрогели на основе желатина, полимерные цепи которого были связаны с помощью окисленного пектина [48]. Показано, что степень сшивки увеличивалась по мере окисления пектина, при этом присутствие сшивающих агентов по сравнению с нативным желатином приводит к снижению набухания и высвобождения желатина. Гидрогели продемонстрировали хорошую способность к заживлению ран для крыс-альбиносов, при этом не было зарегистрировано никаких нежелательных симптомов.

Деэтерификация. В зависимости от степени этерификации пектиновые полисахариды могут быть разделены на высокоэтерифицированные (степень этерификации > 50%) и низкоэтерифицированные (степень этерификации < 50%). Желирующие свойства пектина напрямую зависят от его степени этерификации – высокометоксилированные пектины способны к образованию гелей при рН среды

меньше 3.5 в присутствии большого количества сахарозы (> 65% масс.) путем упаковки метоксильных групп благодаря гидрофобным взаимодействиям и водородным связям. Гелеобразование низкометоксилированных пектинов, в свою очередь, происходит благодаря образованию структуры под названием «яичная коробка» (“egg-box”) с дивалентными катионами в широком диапазоне рН в присутствии и отсутствие сахарозы.

В настоящее время пектин в основном извлекается из кожуры цитрусовых (85.5%) и яблочного жмыха (14.0%), в результате большая часть коммерчески доступного пектина представляет собой высокометоксилированный пектин. Низкометоксилированный пектин встречается лишь в небольшой части сельскохозяйственных продуктов, таких как семена и стебли подсолнечника и т.д. Учитывая ограничения, связанные с низкой урожайностью и нехваткой сырья, низкометоксилированный пектин обычно получают химической (кислотной, щелочной) или ферментативной деэтерификацией высокометоксилированного пектина. Щелочная деэтерификация в настоящее время широко используется для промышленного производства низкометоксилированного пектина. Однако щелочная деэтерификация строго зависит от условий проведения реакции (рН и температуры) и обычно сопровождается реакцией β -элиминирования, вызывающей деградацию молекул пектина. Ферментативная деэтерификация является более экологичным и мягким методом, поддерживающим молекулу пектина путем каталитического удаления метильных групп с использованием пектинметилэстеразы.

В связи с этим в последнее время все большее внимание привлекает ферментативная деэтерификация высокометоксилированного пектина. В частности, проведено сравнительное исследование желирующих свойств [49], физико-химических, реологических и эмульгирующих свойств [50] низкометоксилированных пектинов, полученных с помощью щелочной и ферментативной деэтерификации, а также ферментативной деэтерификации при повышенном давлении. Кроме того, было также определено влияние метода деэтерификации на загрузку куркумина и высвобождение *in vitro* в условиях, моделирующих среду кишечника [51]. Пектин, полученный ферментативной деэтерификацией при повышенном давлении, продемонстрировал более высокую вязкость, сопровождаемую большей средней молекулярной массой, размером частиц и более отрицательным дзета-потенциалом по сравнению с другими

пектинами. Более того, гели, полученные на основе этого пектина, показали более высокую прочность при тех же концентрациях Ca^{2+} и лучшую водоудерживающую способность при том же рН по сравнению с гелями на основе пектина, полученного ферментативной деэтерификацией при нормальном давлении. Более того, использование повышенного давления позволило в десять раз сократить время ферментативной деэтерификации. Также гранулы низкометоксилированного пектина, полученного деэтерификацией при повышенном давлении, продемонстрировали более высокую твердость и эффективность инкапсуляции куркумина при более низком коэффициенте набухания. Кроме того, в ходе эксперимента *in vitro* было показано, что гелевые шарики могут доставлять куркумин в толстую кишку и препятствовать его преждевременному высвобождению в желудке.

Крайне интересную технологию предложили в исследовании [52]. Из кожуры цитрусовых извлекли пектинметилэстеразу, осадили ее и провели реакцию с глутаровым альдегидом для образования трехмерной структуры, способной к высвобождению пектинметилэстеразы. Из остатков кожуры цитрусовых после извлечения пектинметилэстеразы экстрагировали высокометоксилированный цитрусовый пектин. Затем при помощи пектинметилэстеразы провели деэтерификацию цитрусового пектина, а также предварительно экстрагированных из манго и граната пектинов, в результате чего было достигнуто максимальное снижение степени этерификации на 75%, 68% и 66% соответственно, причем в ходе деэтерификации практически не произошло изменения молекулярной массы пектинов и содержания в них галактуроновой кислоты (рисунок 5).

Grafting (прививание). Гидрогелевые носители на основе пектина используются в фармацевтике из-за их биоразлагаемости, биосовместимости и нетоксичности. Чувствительные к рН носители пектина являются идеальными кандидатами для пероральной доставки лекарственных средств из-за их рН-зависимых характеристик протонирования/депротонирования, которые можно использовать для защиты лекарственных средств в неблагоприятных условиях рН и после доставки к целевым участкам. Однако, будучи биоразлагаемым полимером, пектин имеет недостатки в отношении скоростей высвобождения и диффузии из-за высокой растворимости в водной среде. Сшивание двухвалентными катионами, такими как Zn^{2+} , Ca^{2+} , или покрытие другим полимером, таким как хитозан, который может взаимодействовать с

пектином с образованием сложной структуры, может решить эти проблемы. Привитая сополимеризация пектина с гидрофобными полимерами является идеальным и простым методом для улучшения его свойств и расширения его биомедицинских применений для доставки лекарственных препаратов.

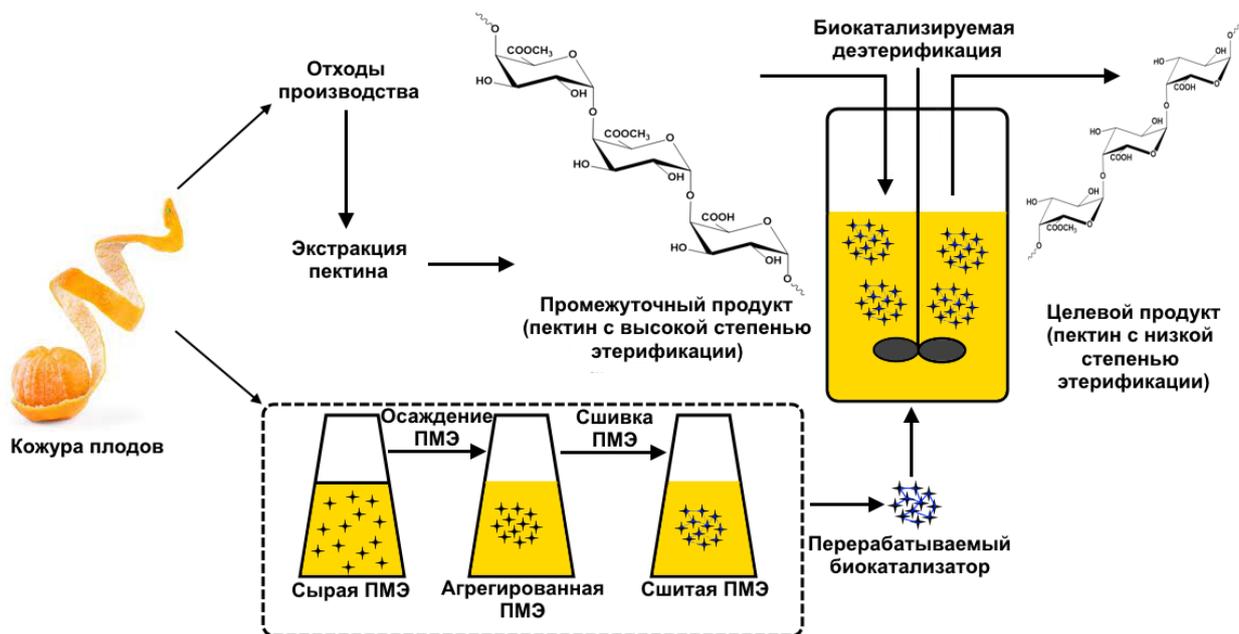


Рисунок 5 – Схематическая иллюстрация получения низкометоксилированного пектина при помощи выделенной из кожуры цитрусовых пектинметилэстеразы, сшитой в трехмерные агрегаты, способные к ее высвобождению.

Турецкими учеными были разработаны термо/pH-чувствительные покрытые микроносители, привитые поли(N,N-диэтилакриламидом) [53] и поли(диметиламиноэтилметакрилатом) [54], содержащие 5-фторурацил в качестве модельного лекарственного средства. В обоих случаях было показано контролируемое и чувствительное к температуре и pH высвобождение лекарственного препарата. Также обе системы продемонстрировали хорошую биосовместимость и дозозависимую активность против клеток L929 благодаря высвобождению действующего вещества.

Предложен метод ферментативной модификации пектина, при котором галловая кислота и пропилгаллат прививаются к молекулам пектина в водно-органической двухфазной системе, катализируемой липазой [55]. Результаты исследования показали, что липаза играет двойную роль во время модификации, катализируя гидролиз метиловых эфирных связей пектина в водной фазе и этерификацию между

гидроксильными группами при четвертом атоме углерода галловой кислоты и пропилгаллата и карбоксильными группами пектина в органической фазе. Кроме того, было оценено влияние галловой кислоты и пропилгаллата на антиоксидантную и антибактериальную активность пектина. Результаты показали, что антиоксидантная и антибактериальная активность привитого пектина была лучше по сравнению с нативным пектином. Также было изучено влияние модифицированного пектина на консервацию окуня (*Lateolabrax maculatus*). Для этого филе окуня промывали химически чистой водой, нарезали в стерильных условиях, взвешивали и наносили на поверхность кусков растворы нативного и модифицированного пектинов. Определяли количество колоний жизнеспособных организмов, уровень гистамина, содержание малонового диальдегида и кислотное число на 0-й, 5-й и 10-й день. Филе окуня, обработанное раствором модифицированного пектина, продемонстрировало лучшие результаты по сравнению с филе, обработанным нативным пектином, во всех проведенных экспериментах. Так, обработка раствором пектина, привитого галловой кислотой, показала ингибирование роста колоний *S. aureus* и *E. coli* в 1.2 и 1.3 раза лучше по сравнению с нативным пектином соответственно, а обработка раствором пектина, привитого пропилагаллатом, показала ингибирование роста колоний *S. aureus* и *E. coli* в 1.6 и 2.5 раза лучше по сравнению с нативным пектином соответственно [55].

Cross-linking (сшивка). Пектин способен выводить ионы тяжелых металлов из организма человека и обладает противовоспалительной, противодиабетической, антиоксидантной и антипролиферативной активностью. Благодаря этому создаются новые лекарственные препараты на основе пектина, как в качестве основного действующего вещества, так и с использованием пектина в виде матрицы для систем доставки лекарственных препаратов. Более того, сшивание пектина с различными материалами позволяет достичь синергизма между ними, что приводит к популярности систем для доставки лекарственных средств на основе пектина.

Так, хлоргексидин использован не только в качестве инкапсулированного активного ингредиента, но и в качестве сшивающего агента для приготовления микрочастиц на основе пектина [56]. Количество хлоргексидина, необходимое для гелеобразования пектина, было меньше, чем обычных дивалентных катионов (Ca^{2+} , Zn^{2+}), используемых в качестве сшивающего агента для ионотропного гелеобразования пектина: по-видимому, хлоргексидин легче связывался с цепями пектина по сравнению

с дивалентными катионами, что можно объяснить его большим молекулярным размером. Эффективность инкапсуляции хлоргексидина составила около 5.5%, выход инкапсуляции – около 44%, а максимальное количество лекарственного препарата, высвобожденного через 6 ч, составило около 7%. В дальнейшем проводили одновременное связывание полимерных цепей пектина с хлоргексидином и диацетатом цинка, что уменьшило его эффективность инкапсуляции до порядка 3%, но увеличило высвобождение до 13%. Полученные продукты представляли собой более структурированные и крупные микрочастицы по сравнению с гелями, сшитыми только дивалентными катионами или только хлоргексидином, благодаря конкуренции между катионами за вакантные места полимерных цепей пектина.

Известны данные о создании составных гранул ламотриджина (противоэпилептического лекарственного средства) с замедленным высвобождением на основе ионотропно сшитых природных полисахаридов (пектина и слизи бамии), а также оптимизации общей концентрации полимеров, их массового соотношения и концентрации кросс-линкера, в роли которого выступал хлорид кальция. [57]. Было исследовано влияние данных переменных на размер гранул, эффективность инкапсуляции лекарственного средства и степень его высвобождения. Показано, что степень высвобождения ламотриджина повышается с увеличением общей концентрации полимеров и концентрации хлорида кальция и уменьшением массового соотношения пектин : слизь бамии. В результате лучший образец (соотношение пектин : слизь бамии = 1.46 : 1) продемонстрировал степень высвобождения инкапсулированного лекарственного препарата $89.2 \pm 4.4\%$.

Композитные пены, состоящие из смеси альгината натрия и пектина, были изготовлены из соответствующих растворов, которых смешивали в соотношениях 10:0, 9:1, 7:3 и 5:5 для определения оптимального состояния пены [58]. Затем композитные пены были сшиты в полимерную сеть посредством взаимодействия с хлоридом кальция. После сушки для определения способности полученных пен к инкапсуляции и высвобождению лекарственных препаратов в них загрузили модельное вещество – бычий сывороточный альбумин. Было показано, что большее содержание пектина в композиционных пенах привело к большему поглощению воды во время испытаний на набухание и более высокой степени высвобождения инкапсулированного бычьего сывороточного альбумина. В тестах на непрямую и прямую цитотоксичность ни одна из

пен не проявила клеточной цитотоксичности в отношении клеток фибробластов и кератиноцитов, что позволяет использовать данные пены для доставки лекарственных препаратов в раны.

Для преодоления нестабильности гелей на основе пектина, связанного ионами кальция, были приготовлены пектиновые носители, химически сшитые путем добавления янтарного ангидрида и глутарового диальдегида в качестве сшивающих реагентов (рисунок 6) [59].

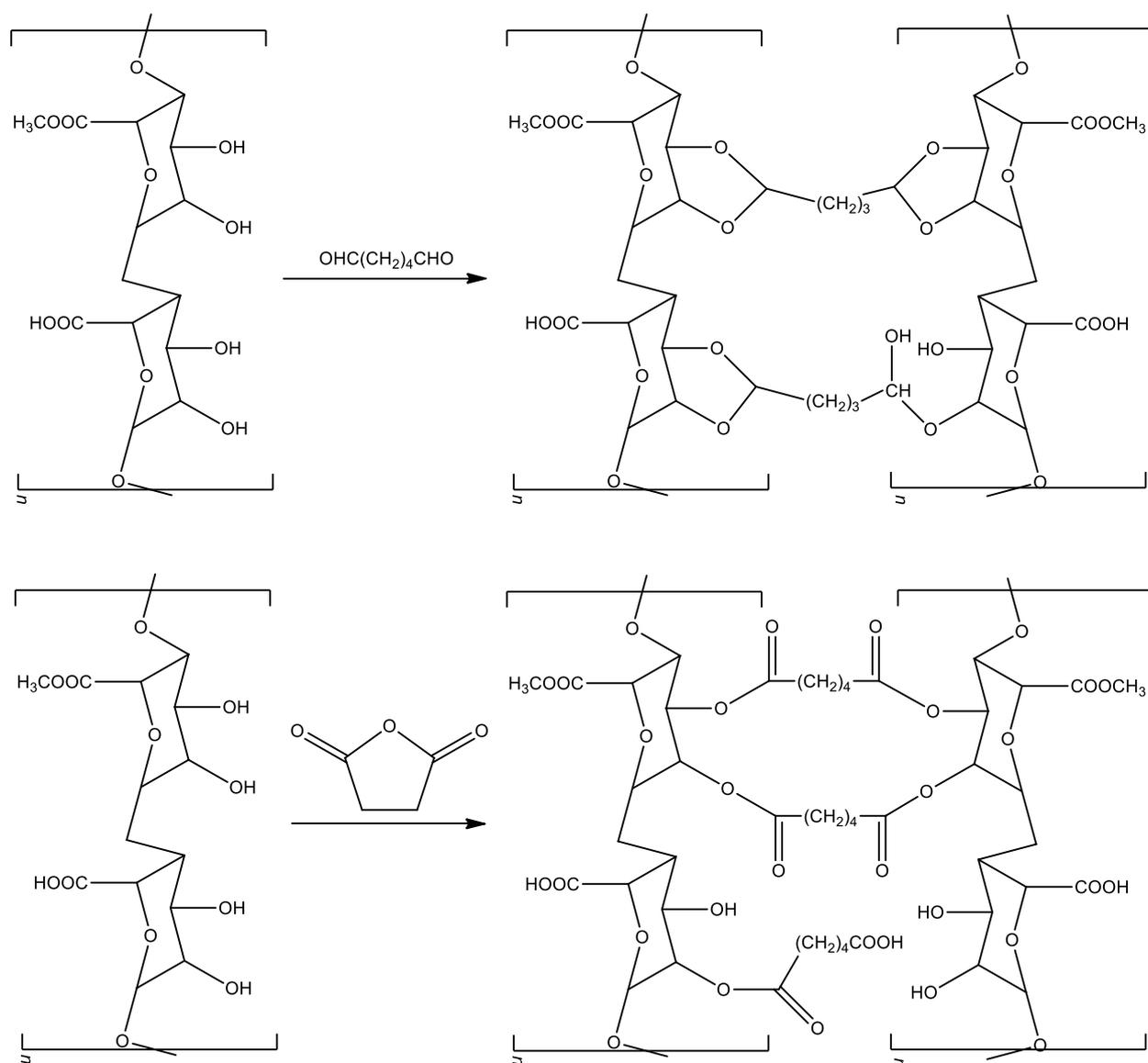


Рисунок 6 – Схема реакции сшивки между пектином и глутаровым диальдегидом/янтарным ангидридом

Диклофенак натрия использовали в качестве модели водорастворимого лекарственного средства для расчета характеристик контролируемого высвобождения. Были измерены эффективность инкапсуляции и эффективность загрузки, достигавшие 78.81% и 7.78% соответственно. Кроме того, было показано, что полученные продукты представляют собой микросферы с гладкой поверхностью и нерегулярной внутренней структурой ввиду использования в качестве сшивающих агентов янтарного ангидрида и глутарового диальдегида.

Крайне востребованным в последнее время является сшивка пектиновых полисахаридов с хитозаном благодаря наличию у пектиновых полимерных цепей свободных карбоксильных групп, а у хитозана – свободных аминогрупп, которые могут образовывать ионные связи с созданием прочной трехмерной сетки. Так, пленки из смеси хитозан/пектин были приготовлены методом литья из раствора [60]. Методами динамического рассеяния света и реологического анализа было установлено, что полиэлектролитные комплексы образуются в результате ионного сшивания карбоксильных групп пектинового полисахарида с аминогруппами хитозана, что привело к изменению свойств растворов с ньютоновских жидкостей на псевдопластичные гелеобразные системы. Показано, что варьированием соотношения хитозан:пектин можно задавать необходимые термомеханические свойства пленок, чтобы обеспечить успешное применение в медицине, доставке лекарств, сельскохозяйственных и пищевых покрытиях.

Относительно новый и интересный класс физических гидрогелей изготавливается путем сшивания гидрофильных полимеров с использованием наночастиц. Процесс гелеобразования происходит за счет адсорбции полимерных цепей на поверхности наночастиц, которые затем действуют как сшивающие агенты. Этот легкий и простой метод, выполняемый в мягких условиях и в отсутствие токсичных реагентов, позволяет производить инъекционные материалы, демонстрирующие регулируемые механические свойства и быстрое самовосстановление после инъекции. Пектиновые гидрогели, сшитые хитозановыми наночастицами, были получены для дальнейшего образования гелей, демонстрирующих зависимость физических свойств от температуры, что позволяет использовать их в качестве матрицы для системы доставки лекарственных средств [61]. Другая возможность получения гидрогелей на основе пектина с хитозаном – физическая сорбция пектина на хитозане, химически модифицированным

триполифосфатом (E451) и химически сшитым генипином. Благодаря предварительной модификации и сшивке у хитозана не остается активных центров, с которыми пектин может взаимодействовать химически, что приводит к спонтанному образованию гидрогелей после окончания взаимодействия и охлаждения реакционной колбы [61].

1.2.2 Формы систем для доставки лекарственных средств на основе пектина

Пектиновые полисахариды (как нативные, так и модифицированные) могут быть использованы для получения новых материалов для доставки лекарственных препаратов. Подобные материалы могут быть созданы путем ионной либо ковалентной сшивки пектиновых цепей напрямую с лекарственными средствами, либо образованием матрицы на основе пектина с другими природными либо синтетическими полисахаридами с последующей загрузкой в полости полученных трехмерных систем небольших молекул, обладающих фармакологической активностью. Кроме того, возможно создание композиций пектина с органическими либо неорганическими веществами, а также эмульсий, например, эмульсий Пикеринга. В результате могут быть получены различные формы систем на основе пектина для доставки лекарственных препаратов.

Одной из наиболее популярных форм является гидрогель. Гидрогели представляют собой сеть сшитых гидрофильных полимерных цепей, при этом сшиваться могут как цепи одного и того же полимера, так и разных. Сшивки, связывающие полимеры гидрогеля, делятся на две основные категории: физические и химические. Физические поперечные связи состоят из водородных связей, гидрофобных взаимодействий и конформационных переплетений цепей. Химические связи реализуются благодаря ионным либо ковалентным связям. Благодаря наличию полостей в трехмерной структуре гидрогелей они могут содержать более 90% масс. воды, а также способны к физической адсорбции и переносу лекарственных препаратов для их адресной доставки. Так, разработана полностью новая система доставки нифедипина – блокатора кальциевых каналов, используемого при ангине и артериальной гипертензии [62]. Для доставки нифедипина использовался гидрогель на основе природного полисахарида (пектина) и синтетического полимера на основе акриловой кислоты, который был получен с помощью свободнорадикальной полимеризации. Полученные

гидрогели продемонстрировали превосходную механическую стабильность и отлично удерживали нифедипин в матрице. Кроме того, гидрогели показали большую термическую стабильность по сравнению с исходными компонентами (пектином и акриловой кислотой).

Ученые из Эквадора [63] разработали новую систему доставки лекарственных препаратов на основе природных полисахаридов: пектина и желатина. Они могут использоваться поодиночке, однако известны системы на основе окисленного пектина, желатина и глицерина, которые, однако, обладают токсичностью. В связи с этим в данной работе используется система на основе пектина, обработанного пероксидом водорода, и желатина без использования глицерина. Полученные гидрогели на основе окисленного пектина продемонстрировали отличную способность к набуханию, кроме того, данные гидрогели показали лучшие результаты высвобождения лекарственных средств (ЛС), что может быть связано с гомогенным распределением ацетаминофена в гидрогеле по сравнению с гидрогелями на основе нативного желатина (без использования пектина), в которых может происходить гетерогенное распределение кристаллов ацетаминофена в объеме гидрогеля.

Оксалиплатин – цитостатический препарат, используемый при метастазирующим раке толстой и прямой кишки на некоторых линиях опухолей. Для доставки оксалиплатина могут использоваться натуральные биополимеры, например, пектин, и синтетические полимерные материалы, например, молочная и метакриловая кислоты. На основе данных материалов могут быть созданы pH-чувствительные гидрогели для точечной доставки оксалиплатина в толстый кишечник. Исследование пероральной переносимости на кроликах подтвердило, что дисперсия гидрогеля хорошо переносилась до 3650 мг/кг массы тела без каких-либо гистопатологических или гематологических изменений по сравнению с контрольной группой [64].

Система доставки гидрохлорида лидокаина на основе физически сшитой матрицы из натуральных биополимеров (хитозана и пектина) была разработана для перевязки ран [65]. В результате было показано, что включение лидокаина в гидрогели не оказало влияния на их функциональную стабильность. Исследования высвобождения лекарственного средства *in vitro* в течение 6 ч соответствовали модели Корсмейера-Пеппаса. Эта работа демонстрирует возможность 3D-печати гидрогеля в качестве подходящего средства для перевязки ран.

В работе иранских ученых [66] были получены пористые и непористые гидрогели на основе пектина для доставки тетрациклина. Тетрациклин – широко используемый антибиотик, обладающий противовоспалительными свойствами – был выбран в качестве модели лекарства и загружен на приготовленные гидрогели. Гидрогели продемонстрировали цитотоксическую активность против *E. coli* и *S. aureus*, проявляющаяся в увеличении зон ингибирования роста колоний *E. coli* и *S. aureus* относительно контроля.

Системы доставки на основе пектина с серебряными наночастицами были созданы для усиления лечения ран [67]. Полученные пектиновые системы продемонстрировали цитотоксичность против *E. coli* и *S. aureus*, проявляющуюся в увеличении зон ингибирования роста колоний *E. coli* и *S. aureus* относительно контрольного образца.

На основе хитозана, пектина или κ-каррагинана с синтетическими полимерами (полимерные формы метакрилата метилового эфира полиэтиленгликоля и 2-диметиламиноэтилметакрилата) были получены гидрогели для доставки лекарственных препаратов [68]. Гидрогели на основе κ-каррагинана продемонстрировали нагрузку на сжатие в 3 и 4 раза большую, чем гидрогели на основе пектина и хитозана соответственно. Все гидрогели показали биосовместимость в тестах на продукцию нитритов: ни один гидрогель не вызывал продукцию нитритов, что означает отсутствие воспалительных процессов. Соответственно, полученные гидрогели могут стать потенциальным биоматериалом для культивирования тканей организма и доставки лекарственных препаратов.

Другой популярной формой систем доставки лекарственных препаратов являются пленки, применяющиеся главным образом для лечения и обработки ран кожного покрова. Их можно использовать отдельно, или вместе с марлевыми повязками либо другими вспомогательными приспособлениями. Но также возможно использование пленок для доставки лекарственных средств через слизистые оболочки, например, в литературе известны исследования о трансбуккальном методе доставки лекарственных препаратов благодаря мукоадгезивным свойствам природных биополимеров. Так, в исследовании [69] была разработана новая система на основе природных биополимеров: пектина и желатиновой камеди. В качестве модельного лекарственного средства использовался куркумин, обладающий противовоспалительной, противораковой и

антиоксидантной активностью. Полученные пленки продемонстрировали механические свойства, зависимые от соотношения геллановая камедь: пектин, и высокую мукоадгезию. Пленки, полученные при соотношении геллановая камедь: пектин = 4: 1, обладали большим статическим давлением по сравнению с пленками, полученными при соотношении геллановая камедь: пектин = 1: 4. Кроме того, пленки показали способность к поглощению жидкости и контролируемому высвобождению куркумина при отсутствии разложения пленки в течение 24 ч. Соответственно, данные пленки имеют потенциал для создания лекарственных препаратов на их основе для контролируемой доставки ЛС в ротовую полость.

Для трансдермальной доставки донепезила – гидрофильного лекарственного препарата, рекомендуемого Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для лечения болезни Альцгеймера (от умеренной до тяжелой степени) были получены нанокомпозитные пленки на основе пектина [70]. Донепезил демонстрирует высокую селективность в том числе и при лечении сосудистой деменции. Однако оральное введение донепезила сопряжено с рядом побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта (тошнота, рвота, диарея), сердечно-сосудистой системы и центральной нервной системы (различные расстройства сна). Поэтому в последние годы все больше исследователей переходят с орального введения данного ЛС к трансдермальному, в особенности благодаря широкому спектру матриц, на основе которых возможно создание композитных пленок (альгинат натрия, пропиленгликоль и т.д.). Более того, добавление серебра к данным композитам приводит к значительному увеличению противомикробных свойств полученных систем. Показано, что способность нанокомпозита к высвобождению ЛС составила около 95% в конце пятидневного периода. Кроме того, были исследованы антимикробные свойства пленок. Они продемонстрировали ингибирование роста бактериальных колоний *S. aureus* и *E. coli*, что показывает, что полученные пленки устойчивы к росту микроорганизмов и безопасны для использования.

Пленки на основе пектина были использованы для доставки куркумина – основного действующего вещества китайских лечебных трав с большим количеством фармакологических свойств [71]. Куркумин легко разлагается, из-за чего он плохо всасывается в кровь и, кроме того, куркумин имеет низкую растворимость в воде. В связи с этим для повышения растворимости и биодоступности куркумина используют

его комплексообразование с полисахаридами. Низкомолекулярное ЛС (куркумин) может быть встроено в сетчатую структуру, образованную полимерными нитями, причем, регулируя структуру сети пленки, можно добиться эффекта замедленного высвобождения лекарственного препарата. Показано, что прочность пленок можно повысить, добавив к пектину другие полисахариды: хитозан или альгинат натрия. Из-за взаимодействия между цепями полисахаридов и куркумина, добавление природных полисахаридов может замедлить высвобождение куркумина. Все три пленки продемонстрировали пролонгированный эффект высвобождения в различных смоделированных системах, причем пленка на основе смеси пектин/альгинат натрия показала наиболее длительный эффект высвобождения. Связывание куркумина полисахаридами приводит также к повышению растворимости куркумина и эффективности инкапсуляции.

Возможно создание композитных пленок [72] на основе полуксамера Pluronic-F127 – трехблочного сополимера (полиэтиленоксид – полипропиленоксид – полиэтиленоксид), используемого для доставки лекарственных препаратов благодаря способности сольбилизовать гидрофобные молекулы и образовывать мицеллярные структуры. Однако данный полуксамер практически не способен образовывать пленки, поэтому в данном исследовании его связывали с желатином и пектином. Для определения способности полученных композиций к связыванию и последующему высвобождению ЛС к данным пленкам добавляли эритромицин в качестве модельного лекарственного препарата. После получения стабильных пленок определили их механические свойства (толщина, потеря растворителя при высушивании, прочность на разрыв и относительное удлинение образца при разрыве). Показано, что композиции полуксамер/желатин и полуксамер/пектин в соотношении 1:4 давали гладкие, однородные, полупрозрачные и гибкие пленки. Кроме того, полученные пленки не проявили цитотоксичность по отношению к клеткам фибробласта человека, но продемонстрировали антибактериальную активность против *S. aureus*, проявляющуюся в снижении минимальной ингибирующей концентрации относительно чистого эритромицина, т.е. эти пленки могут эффективно снижать вероятность вторичной бактериальной инфекции. Это указывает на возможность использования данных пленок для связывания других лекарственных противомикробных препаратов, имеющих в аптечной сети, и для лечения ран.

Для улучшения доступности систем доставки были разработаны микро- и наносферические системы на основе пектина, который связывается или сшивается с другими низко- либо высокомолекулярными соединениями для создания трехмерной сферической матрицы, в полость которой может быть инкапсулирован лекарственный препарат. Так, получены системы для доставки метформина – лекарственного препарата, широко используемого при терапии диабета второго типа [73]. Однако метформин демонстрирует низкую биодоступность и короткое время жизни, из-за чего больным приходится вводить большие дозы препарата, что может вызвать появление побочных эффектов. Для нивелирования этих эффектов было принято решение создать систему для контролируемой доставки ЛС на основе природных биополимеров – пектина и хитозана. Для улучшения свойств и структуры подобных систем часто используются различные неорганические материалы. В данном случае было принято решение добавить минеральные глины для повышения адсорбционных и ионообменных свойств систем для доставки метформина. После получения микросфер определили эффективность инкапсуляции метформина и абсолютное количество связанного ЛС, исследовали микросферы методами порошковой рентгеновской дифракции и сканирующей электронной микроскопии, а также установили профили высвобождения лекарственного препарата *in vitro*. Показано, что каждый из компонентов полученной системы для доставки метформина демонстрирует влияние на свойства и структуру биоконструктов: пектин снижает количество ЛС, высвобождающегося в желудке; хитозан благодаря мукоадгезивным свойствам увеличивает время нахождения микросфер в кишечнике, а минеральные глины выступают в роли резервуара для медленного высвобождения метформина. Таким образом, синергетическое взаимодействие трех компонентов позволяет создать системы для контролируемой доставки метформина.

На основе пектина и гипромеллозы (гидроксипропилметилцеллюлозы) была разработана система доставки мелатонина в качестве модельного лекарственного препарата [74]. Мелатонин – гормон, участвующий в регуляции циркадных ритмов и демонстрирующий антиоксидантные и иммуностимулирующие свойства. Однако область его применения ограничена ввиду его фотохимической нестабильности, из-за чего необходимо покрывать его оболочкой для защиты от фотодеградациии. Для этого могут использоваться биосовместимые и нераздражающие натуральные биополимеры,

обладающие мукоадгезивными свойствами - пектин и гипромеллоза. После получения микросфер определили эффективность инкапсулирования и степень загрузки мелатонина; определили профиль высвобождения мелатонина *in vitro*. Показано, что полученные микросферы продемонстрировали полную инкапсуляцию мелатонина и повышенную скорость растворения по сравнению с нативным мелатонином. Кроме того, среди всех протестированных комбинаций микросферы, содержащие пектин с гипромеллозой в массовом соотношении 1:3, обеспечивали наивысшую способность к набуханию и наиболее заметные мукоадгезивные свойства.

В работе [53] были получены системы для доставки лекарственных препаратов на основе пектина, покрытых хитозаном. Для улучшения физико-химических свойств пектиновой матрицы было принято решение привить к ней поли-(N,N-диэтилакриламид) – термочувствительный гидрофобный полимер. В качестве модельного лекарства был использован 5-фторурацил, который обладает широким спектром действия против различных опухолей, таких как рак желудка, толстой кишки, прямой кишки и др. Установлено, что микросферы с соотношением ЛС : сополимер = 2 : 1 показали лучшую эффективность инкапсуляции ($72.98 \pm 0.01\%$). Противораковая активность полученных систем для доставки флюороурацила *in vitro* показала ингибирование роста клеток рака легких человека A549, не оказывая при этом цитотоксического действия на клетки фибробластов L929. Соответственно, данные микросферы можно использовать для адресной доставки ЛС.

Показано, что микросферы из пористого крахмала, загруженные доксорубицином, покрытые пектином или смесью пектин/хитозан, обеспечивают длительное высвобождение лекарства, что позволяет клинически сократить время приема препарата [75]. Эта система имеет большое потенциальное применение в доставке лекарств в кишечник для лечения колита и рака толстой кишки. Установлено, что полученные микросферы эффективно высвобождают доксорубицин в толстом кишечнике. Следовательно, смесь пектина, хитозана и пористого крахмала может найти применение для создания систем пероральной доставки лекарственных препаратов.

Так же, как и микро- и наносферы, наночастицы металлов привлекают внимание ученых, благодаря возможности синтеза наночастиц определенной формы и размера, которые обеспечат лучшую биодоступность и большую степень инкапсуляции малых биомолекул. Кроме того, поверхность наночастиц может быть функционализирована

природными либо синтетическими полимерами. В исследовании [76] получены системы на основе золотых наночастиц, которые широко используются для доставки лекарственных препаратов. В данной работе для модификации и покрытия наночастиц использовался пектин, а в качестве модельного лекарственного препарата был взят куркумин. После получения наночастиц исследовали эффективность инкапсулирования куркумина и профиль его высвобождения *in vitro*; сделали тест на антибактериальную активность наночастиц. Результаты показали, что наночастицы диаметром 100 нм имели самую высокую эффективность инкапсуляции ЛС. Исследование скорости высвобождения куркумина при 37°C в течение 48 ч показало, что количество высвобожденного лекарственного средства было выше при кислом значении pH, чем при pH 7.4. Кроме того, полученные наночастицы продемонстрировали такой же ингибирующий эффект на рост колоний *E. coli* и *S. aureus*, как и чистый куркумин в эквивалентной дозе.

В работе [4] были получены наночастицы на основе разветвленного крахмала. Он был модифицирован путем добавления аминогрупп для получения катионизированного разветвленного крахмала. Затем комбинация положительно заряженного катионизированного разветвленного крахмала и отрицательно заряженного к-каррагинана (либо комбинация катионизированного разветвленного крахмала и низкометоксилированного пектина) использовалась для создания наночастиц, способных инкапсулировать галлат эпигаллокатехина – катехин, содержащийся в чае. После получения катионизированного разветвленного крахмала определили степень замещения аминогруппами, эффективность инкапсулирования куркумина и профиль его высвобождения *in vitro*; сделали тест на антибактериальную активность наночастиц. Показано, что возможно создание наносистем на основе катионизированного разветвленного крахмала и отрицательно заряженных полисахаридов (пектин, к-каррагинан) с последующей инкапсуляцией галлата эпигаллокатехина (максимальная эффективность включения составила 87.8%). Более того, показано дозозависимое снижение минимальной ингибирующей концентрации против *E. coli* и *S. aureus* при повышении количества галлата эпигаллокатехина в наночастицах.

Кроме систем на основе пектина, в которых связь между пектиновыми цепями и низко- и высокомолекулярными соединениями является химической (ионной или ковалентной), возможно создание композитных материалов на основе пектина. В работе

[77] были получены нанокомпозиты на основе пуллулана как средства доставки эрлотиниба – лекарства, используемого для лечения немелкоклеточного рака легких. Эрлотиниб демонстрирует лучшие показатели по эффективности борьбы с прогрессирующим и метастазирующим раком легких по сравнению со стандартными методами лечения рака (например, химиотерапией), однако он плохо растворим в воде и медленно усваивается в ЖКТ. Поэтому настоящая статья была посвящена созданию водорастворимых и биодоступных фармацевтических композиций на основе эрлотиниба. Для этого пуллулан, природный гомополисахарид, состоящий из остатков мальтотриозы, был химически модифицирован. Физико-химические свойства полученного карбоксиметилпуллулана были определены с помощью ИК-спектроскопии, метода ТГ/ДСК, порошковой рентгеновской дифракции и сканирующей электронной микроскопии. Затем на основе карбоксиметилпуллулана были получены нанокомпозиты с оксидом цинка, к которым также добавили анионные полисахариды (альгинат натрия / низкометоксилированный пектин / геллановая камедь), которые покрыли раствором эрлотиниба. У полученных нанокомпозитов определили влияние добавленного полисахарида на степень связывания ЛС и профиль высвобождения *in vitro*. Показано, что нанокомпозиты с добавкой геллановой камеди, покрытые эрлотинибом, продемонстрировали наибольшую степень связывания ЛС, равную $70.43 \pm 4.57\%$, а также лучший профиль высвобождения по сравнению с другими композитами и чистым ЛС.

В исследовании [78] речь идет о приготовлении и характеристике глинистого полимерного нанокомпозита, используемого в качестве носителя диклофенака. Глины часто используются в фармацевтической промышленности в качестве инертного наполнителя и формообразующего вещества при создании модифицированных систем для доставки ЛС. В качестве основы для таких систем используются биополимеры, например, пектин и хитозан, которые вместе с глиной помогают устранить некоторые побочные эффекты лекарственных препаратов. Так, в данной работе в качестве ЛС использовался диклофенак, инкапсуляция которого в систему на основе глины и биополимеров позволяет нивелировать негативные эффекты диклофенака со стороны ЖКТ, например, гастрит, диспепсию, эрозии и язвы желудка. Показано, что наблюдается полная инкапсуляция диклофенака и его равномерное распределение в полимерной структуре во время процесса загрузки лекарственного средства, таким

образом получается новая форма ЛС, обладающая другими физико-химическими свойствами по сравнению с нативной натриевой солью диклофенака. Более того, полученные нанокомпозиты могут стать многообещающим препаратом для контролируемого процесса высвобождения анионных лекарственных препаратов.

В работе [79] были получены композиты на основе пектина и куркумина, определено содержание куркумина в композитах и профиль высвобождения *in vitro*, а также проведен анализ цитотоксичности. Показано, что в ходе реакции происходит образование стабильного композита с быстрым высвобождением куркумина в кислой среде, что подтверждается высокой цитотоксичностью полученных композитов против клеточных линий рака кишечника человека KYSE-30.

Как и нанокомпозиты, таблетированные формы для доставки лекарственных средств остаются крайне востребованными ввиду возможности в довольно широком диапазоне массовых соотношений изменять конечный состав готовых таблеток. В исследовании [80] получены системы для доставки метранидазола в кишечник на основе природных биополимеров – хитозана и пектина. Метранидазол – лекарственный препарат, рекомендованный для лечения амёбиоза (амебной дизентерии, заболевания толстого кишечника, вызываемого *Entamoeba histolytica*). Для дополнительной защиты полученные системы покрывались оболочкой из синтетического полимера Carbopol 934P, необходимого для высвобождения и последующего всасывания ЛС в условиях толстого кишечника. После получения таблеток определяли их толщину, прочность, сыпучесть и кинетику высвобождения лекарственного препарата *in vitro*. Полученные таблетки продемонстрировали высвобождение метранидазола в условиях толстого кишечника на уровне 95-99% для систем на основе хитозана и 94-99% для систем на основе пектина. Кроме того, таблетки с покрытием из Carbopol 934P не показали значительных изменений в своей структуре и составе при выдерживании в регуляторе влажности воздуха в течение 6 недель при 40°C и 75% влажности, в отличие от таблеток без оболочки.

К сожалению, опубликованных результатов по разработке вагинальных систем очень мало, хотя в настоящее время используются различные лекарственные формы, такие как гели, диафрагмы и пленки. Вагинальные таблетки обладают множеством интересных свойств, включая высокую стабильность, малый размер и низкие производственные затраты по сравнению с другими системами с контролируемым

высвобождением. Поэтому они могут быть полезны для контролируемого высвобождения дапивирина (вагинального бактерицида, подавляющего репликацию вируса иммунодефицита человека) с использованием гелеобразующих и мукоадгезивных полимеров, таких как камедь плодов рожкового дерева, пектин и хитозан [81]. После получения таблеток определили профиль высвобождения ЛС, способность к биоадгезии, цитотоксичность относительно МТ-2, линии лимфобластоидных клеток, и НЕС-1А, клеточной линии, полученной из матки. Показано, что таблетки дапивирина на основе пектина показали умеренно пролонгированное набухание с течением времени и обеспечивали замедленное высвобождение лекарственного средства до пяти дней с хорошо воспроизводимой силой биоадгезии. Кроме того, профили высвобождения ЛС из полученных таблеток не зависели от количества пектина в составе, в отличие от таблеток на основе хитозана и камеди плодов рожкового дерева, что позволяет снизить затраты на производство (количество дапивирина составляло 30 мг, масса полимеров варьировалась от 145 до 290 мг). Таким образом, полученные таблетки могут быть использованы для предотвращения передачи вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) половым путем.

Для доставки лекарственных препаратов необходимо создание системы высвобождения ЛС, чувствительной к рН и концентрации ферментов, так как в толстом кишечнике обитают колонии бактерий, которые производят специфические ферменты. Для достижения данной цели были получены системы для доставки лекарственных препаратов на основе пектина и многослойных углеродных нанотрубок [82]. Для улучшения физико-химических свойств пектиновой матрицы было принято решение добавить к ней многослойные углеродные нанотрубки для решения практических клинических проблем. В качестве модельного ЛС в данном исследовании использовали целекоксиб, нерастворимый в воде нестероидный противовоспалительный препарат. Связывание целекоксиба в комплекс с пектином и углеродными нанотрубками позволило улучшить водорастворимость, а, следовательно, и биодоступность целекоксиба. После получения систем определили профиль высвобождения ЛС. Показано, что полученные таблетки достигли участка толстой кишки для доставки лекарственных препаратов, а затем высвобождения лекарства при расщеплении пектиназой. Соответственно, данные таблетки могут быть использованы в качестве специфической системы доставки лекарств в толстую кишку.

Еще одной перспективной системой доставки лекарственных средств являются конъюгаты на основе пектиновых полисахаридов. Так, с использованием микрокапсул из диоксида кремния, сшитых с пектином через специальные дисульфидные связи [83] была разработана новая композиция касугамицина, которая реагирует на различные биологические стимулы, вызываемые вредителями (рисунок 7).

Касугамицин является аминогликозидным антибиотиком, первоначально выделенным из *Streptomyces kasugaensis*, который широко используется для лечения болезней у растений. Однако его фототермическая нестабильность и низкая эффективность чрезвычайно ограничивают применение касугамицина. Поэтому важной задачей является обеспечение максимальной биологической активности препарата в активном центре. Результаты показали, что полученные микрокапсулы эффективно повышают термическую и фотохимическую стабильность касугамицина. Микрокапсулы продемонстрировали превосходные свойства двойной чувствительности к пектиназе и глутатиону, а кинетика высвобождения, исследованная моделью Ригера-Пеппаса, предполагала сочетание различных механизмов высвобождения. По сравнению с исходным порошком касугамицина полученные микрокапсулы обладали устойчивой и улучшенной антимикробной эффективностью в отношении *Erwinia carotovora*. Таким образом, микрокапсулы потенциально могут использоваться в сельском хозяйстве в качестве системы с контролируемым высвобождением.

Возможна сшивка пектина пектин с помощью реакции сочетания либо с тиогликолевой кислотой, либо с дигидрохлоридом цистамина с образованием тиолированных пектинов (рисунок 8) [84].

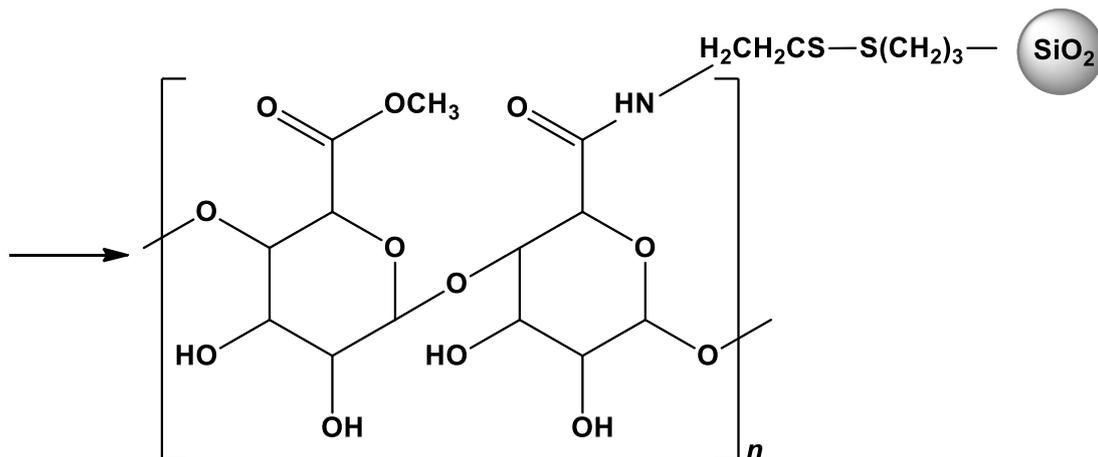
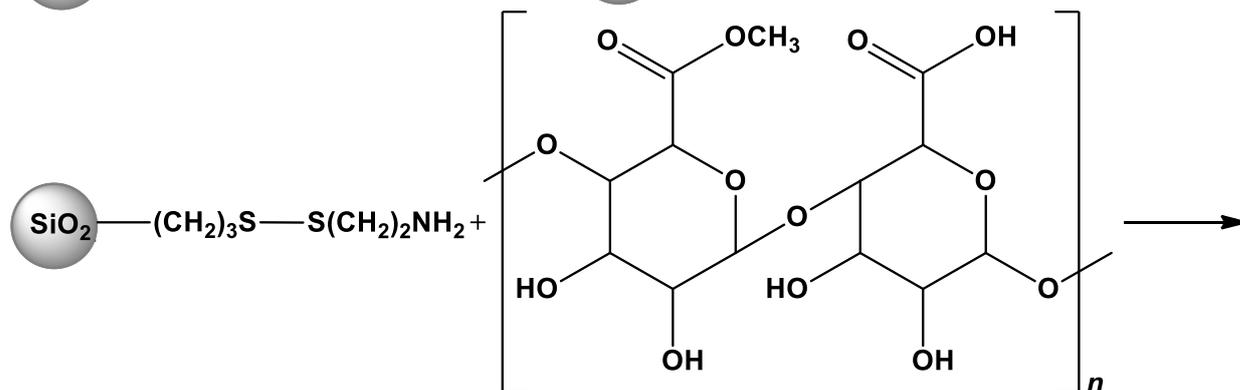
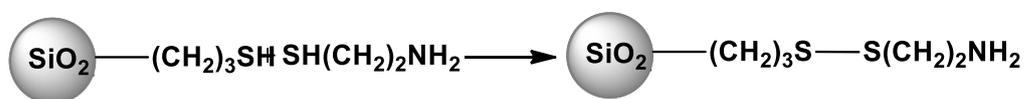
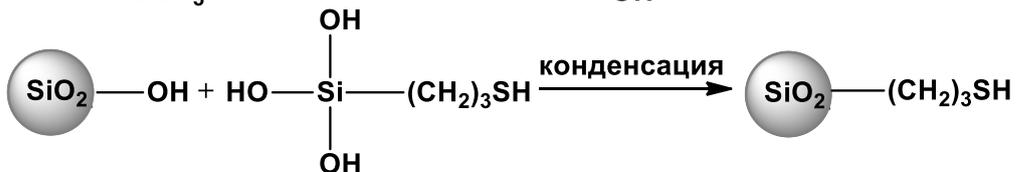
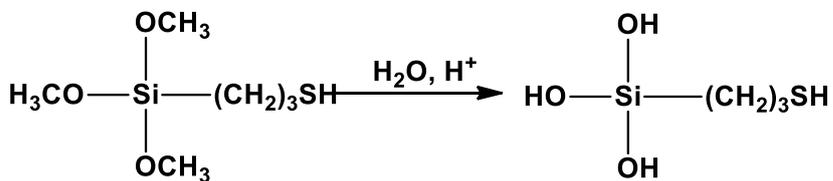
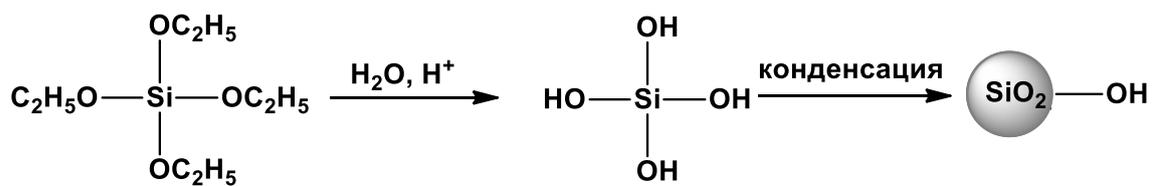


Рисунок 7 – Механизм синтеза микрокапсул пектин: диоксид кремния

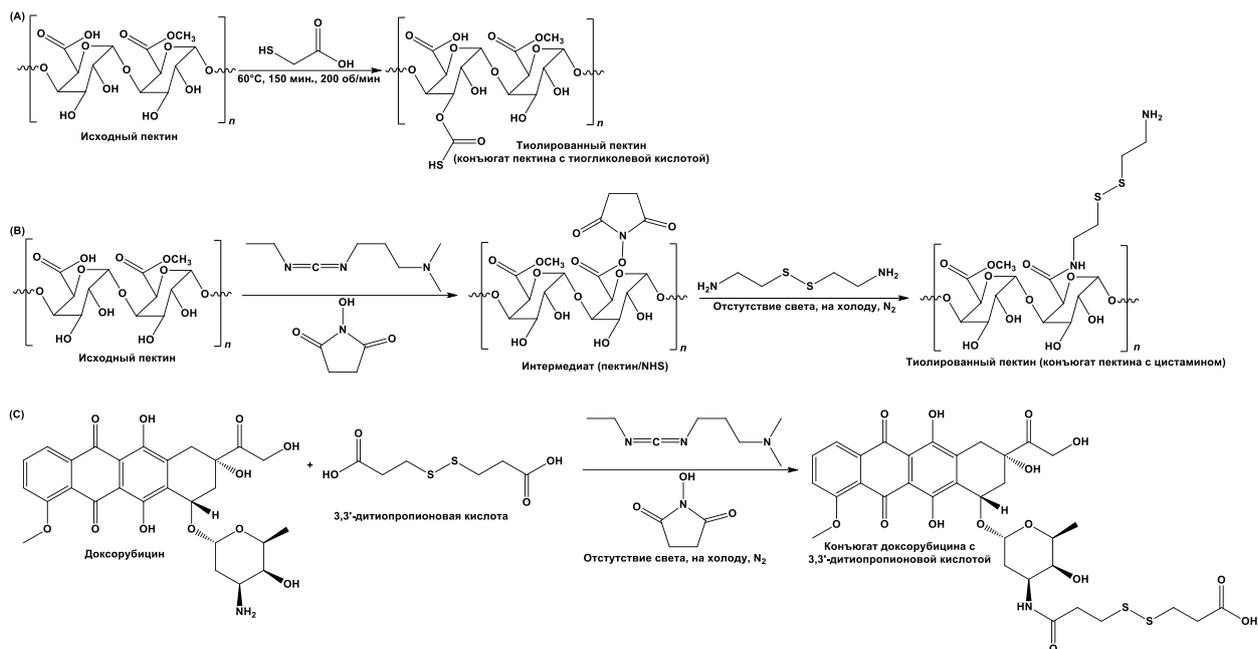


Рисунок 8 – Получение тиолированного пектина

Затем тиолированные пектины соединяли с производным доксорубина (DOX) для получения конъюгатов тиолированный пектин-DOX двумя различными способами: через образование дисульфидной связи и через обмен дисульфидной связи (рисунок 9). Метод обмена дисульфидных связей обеспечил простой, быстрый и эффективный подход к синтезу конъюгатов тиолированный пектин-DOX по сравнению с методом образования дисульфидных связей. Были определены характеристики, физико-химические свойства и морфология тиолированных пектинов и конъюгатов тиолированный пектин-DOX. Было обнаружено, что содержание доксорубина в конъюгатах тиолированный пектин-DOX с использованием низкометоксилированного пектина выше, чем при использовании высокометоксилированного пектина. Противоопухолевая активность *in vitro* конъюгатов тиолированный пектин-DOX была значительно выше, чем у свободного доксорубина, для клеток карциномы толстой кишки мыши и остеосаркомы человека. При этом активность полученных конъюгатов незначительно отличается от активности свободного доксорубина против клеток рака предстательной железы человека. Благодаря своей противоопухолевой активности полученные конъюгаты тиолированный пектин-DOX могут стать матрицей для создания лекарственной платформы для доставки доксорубина при колоректальном раке.

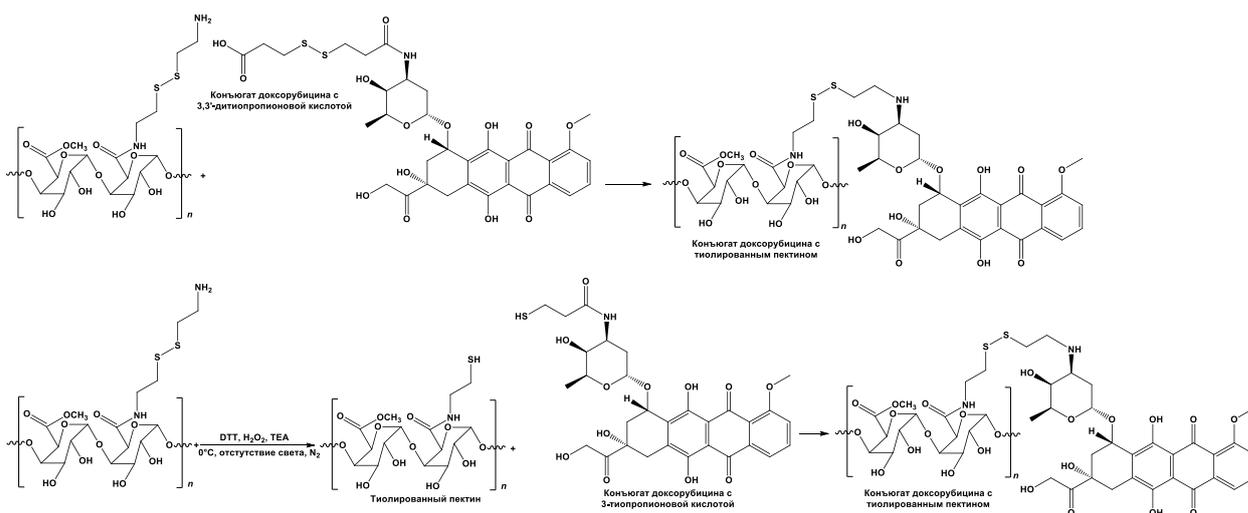


Рисунок 9 – Получение конъюгатов тиолированный пектин-доксорубин

В исследовании [85] были разработаны новые микросферы для перорального применения на основе доксорубина (DOX), конъюгированного с тиолированным пектином через восстанавливаемые дисульфидные связи. Микросферы были получены ионотропным гелеобразованием с катионами Al^{3+} , Ca^{2+} и Zn^{2+} . Результаты показали, что с использованием ацетата цинка можно получить самые прочные микросферы правильной формы. Однако микросферы, приготовленные из конъюгата тиолированного пектина с доксорубином, были очень мягкими и имели неправильную форму. Для получения микросфер с подходящей прочностью и формой в состав добавляли нативный пектин, что привело к установлению размера частиц в диапазоне от 0.87 до 1.14 мкм, при этом морфология микросфер была охарактеризована с использованием методов оптической и сканирующей электронной микроскопии. Профили высвобождения лекарственного средства показали, что в восстановительных средах конъюгат тиолированного пектина с доксорубином может отсоединиться в результате расщепления дисульфидных связей и, следовательно, высвободить DOX. Кинетика высвобождения в среде без восстанавливающего агента для микросфер, содержащих конъюгаты, соответствует модели Корсмейера-Пеппаса, тогда как кинетика в среде с восстановителем соответствует модели высвобождения нулевого порядка. Эти результаты позволяют предположить, что микросферы, содержащие конъюгат тиолированного пектина с доксорубином, могут быть многообещающей платформой для доставки DOX в терапии рака.

Авторами [86] разработан полисахаридно-металлический комплекс модифицированного дофамином пектина, связывающего соединение рутения, который проявляет определенную специфичность ингибирования к клеточной линии аденокарциномы почечных клеток человека 786-О (рисунок 10). Химическая структура и физические свойства полученного комплекса были охарактеризованы методами ИК- и ЯМР-спектроскопии, порошковой рентгеновской дифракции, просвечивающей электронной микроскопии и динамического светорассеяния. Результаты показали, что пектин, связанный с дофамином, успешно координируется с комплексом рутения с образованием наноконъюгатов, которые самоорганизуются в относительно правильные наносферы размером ~ 200 нм. Комплекс пектин-дофамин может снижать токсический эффект рутения на нормальную клеточную линию, например, на нормальную почечную эпителиальную клеточную линию 293А человека.

Сорафениб представляет собой химиотерапевтический препарат, использующийся при гепатоцеллюлярной карциноме. Однако он обладает целым рядом побочных эффектов, в числе которых повышение артериального давления, тошнота, рвота; в некоторых случаях отмечаются ишемия и сердечная недостаточность. Для нивелирования данных эффектов сорафениб был загружен в мицеллы пектин-дезоксихолевая кислота, а затем у полученных продуктов были измерены размер частиц и дзета-потенциал. Также была проведена оценка способности мицелл предотвращать миграцию раковых клеток. Показано, что относительная миграция клеток HepG2, обработанных мицеллами, была снижена до 6.67% по сравнению со свободным сорафенибом, у которого данный параметр составил 26.67%. Таким образом, разработанные мицеллы являются перспективными для противоопухолевого воздействия на гепатоцеллюлярную карциному [86].

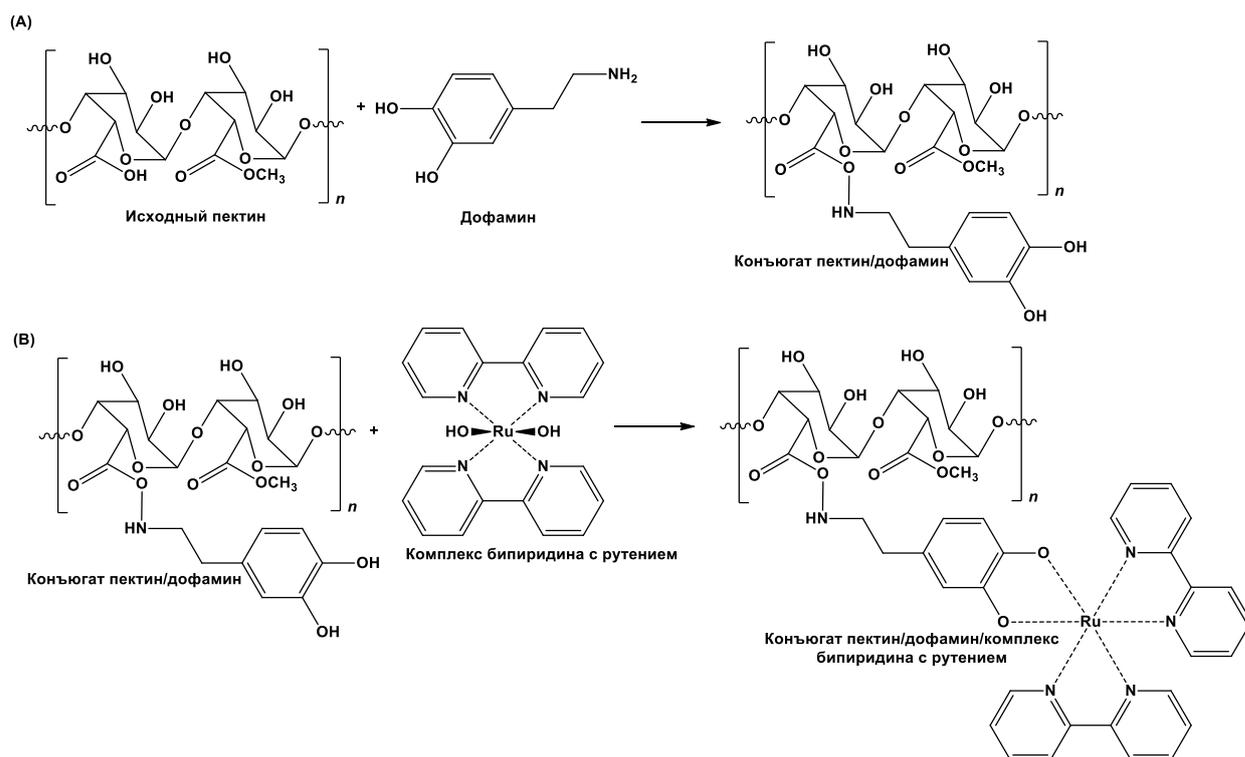


Рисунок 10 – Синтез комплекса пектин-дофамин (а) и конъюгатов комплекса с рутением (б)

Для доставки неогесперидина были получены конъюгаты пектин-хитозан на поверхности липосом [87]. Полученные липосомные системы охарактеризовали с помощью комплекса методов (ИК- спектроскопия, метод динамического светорассеяния (измерения в растворах размеров частиц и дзета-потенциалов), а также высвобождение неогесперидина из конъюгатов *in vitro*, исследование антиоксидантной активности, цитотоксичности). Подтверждено образование конъюгатов на поверхности липосом; показано, что связывание неогесперидина в конъюгат позволило улучшить кинетику и контроль высвобождения неогесперидина в кислой среде.

Конъюгаты пектина, полиэтиленгликоля и урсоловой кислоты, которые затем связывали с гидроксикамптотецином (гидрофобным лекарством, используемым в терапии рака), были получены методом самосборки для стабилизации лекарственного препарата, улучшения его растворимости и контроля высвобождения [88]. Показано, что за счет наличия в полученных наночастицах урсоловой кислоты и гидроксикамптотецина, проявляющих противораковую активность, между ними

реализуется синергетический эффект, значительно увеличивающий конечную эффективность полученных наночастиц по сравнению с исходными соединениями.

В исследовании [89] был получен иминный конъюгат окисленного периодатом натрия цитрусового пектина и амфотерицина В (amphotericin B, AmB) в боратном буфере (рН 11) при концентрации $\sim 20\%$ масс. Затем иминный конъюгат восстанавливали боргидридом натрия, чтобы получить более стабильные аминные конъюгаты. Конъюгаты пектин-AmB оценивали на их противогрибковую активность в отношении *C. albicans* и *A. fumigatus*. Минимальная ингибирующая концентрация против *C. albicans* составляла 0.19 мг/мл как для иминных, так и для аминных конъюгатов пектин-AmB, тогда как против *A. fumigatus* минимальная ингибирующая концентрация составляла 6.25 мг/мл для иминных конъюгатов и 25 мг/мл для аминных конъюгатов. Конъюгаты также проявляли сильную антилейшманиозную активность против различных штаммов *L. donovani*. Так, значения IC₅₀ (концентрация полумаксимального ингибирования) для иминного и аминного конъюгатов против внутримакрофаговой амастиготы *L. donovani* LV9 составляли 0.25 ± 0.02 мг/мл и 0.13 ± 0.02 мг/мл соответственно по сравнению со значением 0.03 ± 0.01 мг/мл для чистого AmB. Более того, в то время как чистый AmB вызывал 71% гемолиза в крови человека в концентрации 10 мг/мл, конъюгаты пектин-AmB проявляли незначительную гемолитическую активность, показывая лишь 0.6-0.9% гемолиза при концентрации AmB 100 мг/мл. Таким образом, конъюгаты пектина с амфотерицином В (в особенности аминные) могут быть использованы при лечении лейшманиозов.

Для доставки лекарственных средств в толстый кишечник была разработана система доставки лекарств, предназначенная для толстой кишки, с использованием пористого крахмала (porous starch, PS), пектина и хитозана [90]. Пористый кукурузный крахмал был приготовлен путем гидролиза с комбинацией α -амилазы и амилоглюкозидазы, и охарактеризован сканирующей электронной микроскопией, которая показала образование пористых структур в гранулах крахмала. Анализ удельной поверхности Брунауэра-Эммета-Теллера показал, что удельная поверхность PS (0.8768 - 0.9448 м²/г) была в 19.88-21.42 раза больше, чем у нативного кукурузного крахмала (0.0441 м²/г). Средний диаметр пор гранул PS составил 40.52-62.42 нм. Доксорубицин загружали в гранулы PS, которые затем покрывали раствором комплекса пектин/хитозан. Результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии

показали, что доксорубицин успешно абсорбируется в гранулах PS. Кроме того, *in vitro* была продемонстрирована эффективность этой схемы доставки, так как в верхнем отделе желудочно-кишечного тракта наблюдалось только 13.80% высвобождения доксорубицина, в то время как для конъюгатов пектин/PS/доксорубицин и пектин/доксорубицин наблюдалось высвобождение 17.56% и 67.04% соответственно. Был сделан вывод о том, что использование пористого крахмала вместе с покрытием пектин/хитозан является эффективным методом доставки лекарств до прямой кишки по сравнению с простой полисахаридной системой пектин/хитозан.

Для оптимизации действия лекарств были разработаны новые лекарственные формы на основе пироксикама [91]. Это исследование было вдохновлено растущим интересом к области макромолекулярных пролекарств, и в качестве модельного лекарственного средства использовался малеат пироксикама. Всего было синтезировано пять пролекарств с использованием бета-циклодекстрина, хитозана, пектина, яичного альбумина и бычьего сывороточного альбумина. Синтезированные конъюгаты были охарактеризованы методами УФ, ИК и ЯМР спектроскопии. Исследования гидролиза *in vitro* проводили при pH = 1.2, pH = 7.4, pH = 9.0 и в плазме крови человека 80% с последующей оценкой анальгетического, противовоспалительного и противоязвенного потенциала *in vivo*. Было установлено, что степень гидролиза пропорциональна увеличению pH. Было обнаружено, что конъюгат бета-циклодекстрина обладает значительной анальгетической активностью, тогда как конъюгат хитозана является лучшим противовоспалительным средством. Пектиновый конъюгат обеспечивал максимальную защиту от ulcerогенного действия на стенки ЖКТ.

1.2.3 Нестероидные противовоспалительные препараты

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВС) – это группа лекарственных препаратов, которые обладают обезболивающим, жаропонижающим и противовоспалительным эффектами. Термин «нестероидные» (т.е. негормональные) в названии подчеркивает их отличие от средств, обладающих не только противовоспалительным, но и другими (иногда нежелательными и даже опасными) свойствами стероидов. Главный механизм действия НПВС – замедление процесса

образования простагландинов (тканевых медиаторов, способствующих развитию воспаления и сопровождающей его боли).

Наиболее распространенные виды НПВС: аспирин, анальгин, диклофенак, ибупрофен и кетопрофен. Лекарственные препараты этой группы обычно выпускаются в таблетках и капсулах, растворах для инъекций, в форме мазей и гелей. Условно НПВС принято разделять, основываясь на структуре химических соединений. Так, существуют производные салициловой кислоты (например, ацетилсалициловая кислота), арильные и гетероарильные производные уксусной кислоты (например, ибупрофен), индоловые и инденовые производные уксусной кислоты (например, индометацин), производные фенилуксусной кислоты (например, диклофенак) и производные еноловой кислоты (например, пироксикам).

С открытием механизма действия аспирина Джоном Вейном (Нобелевская премия 1982 г.) расширились возможности разработки новых противовоспалительных терапевтических средств. Благодаря болеутоляющему, жаропонижающему, противовоспалительному действию эти препараты широко используются для лечения боли, лихорадки и воспаления при ревматических заболеваниях, остеоартрите и дисменорее. Широкая распространенность также объясняется отсутствием побочных эффектов, которые присущи опиатам (седация, угнетение дыхания и привыкание).

Однако НПВС имеют ряд побочных эффектов, которые стоит иметь в виду при их употреблении. Некоторые побочные эффекты представлены на рисунке 11.

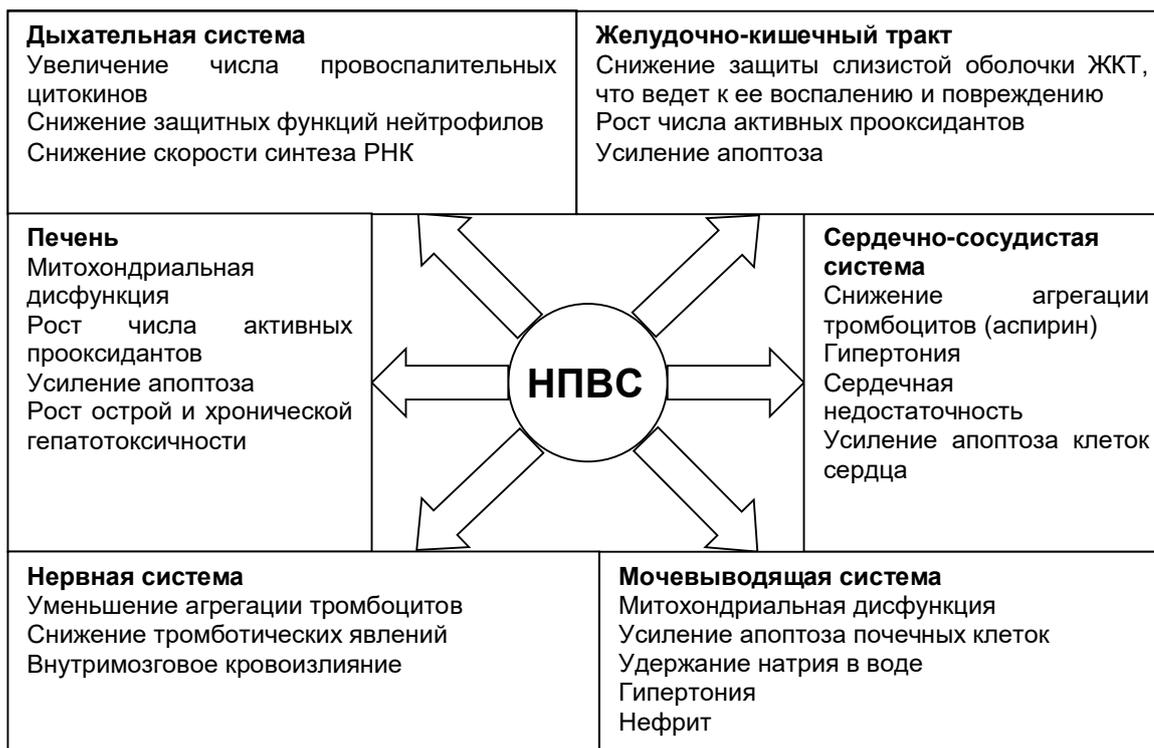


Рисунок 11 – Побочные эффекты НПВС

Они включают в себя урон слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, снижая ее защиту и увеличивая воспаление и апоптоз; со стороны сердечно-сосудистой системы: повышение артериального давления, апоптоза клеток сердечной мышцы и, как следствие, увеличение вероятности инфаркта миокарда; со стороны печени: увеличение гепатоцеллюлярного апоптоза, приводящего к острой и хронической гепатотоксичности; со стороны мочевыводящей системы: задержке в организме воды и ионов натрия, что может привести к увеличению артериального давления и нефрита. Для нивелирования подобных эффектов в настоящее время используется стратегия «фармакофорной модификации», которая заключается в создании новых лекарственных форм, содержащих в качестве активного соединения нестероидный противовоспалительный препарат, который физически либо химически связан с матрицей, которая высвобождает инкапсулированное средство при точно заданных условиях. Это позволяет минимизировать риски того, что организму пациента будет нанесен значительный вред [7].

1.2.4 Антибиотики

В настоящее время крайне актуальным является создание новых систем для доставки противомикробных препаратов, использующих в качестве матрицы различные полимеры [92 ; 93 ; 94]. Одной из наиболее распространенных является группа тетрациклинов и, в частности, родоначальник этой группы – антибиотик тетрациклин.

Тетрациклин (ТС), как и другие антибиотики, обладающие широким спектром антибактериального действия, активен в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных бактерий и обладает бактериостатическим действием. Он используется для лечения инфекций дыхательных и мочевыводящих путей, терапии тяжелых инфекций типа сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, для эрадикации *Helicobacter pylori* и при других инфекционных заболеваниях, вызванных микроорганизмами, которые чувствительны к нему. Тетрациклин – препарат, малорастворимый в воде (~400 мг/л), труднорастворимый в спирте (~20 г/л). Как и другие антибиотики, он вызывает тяжелые поражения желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), изменения слизистых оболочек рта и ЖКТ, дисбактериоз, аллергические кожные реакции, отек Квинке и др. Особенно токсическому действию антимикробных препаратов подвержены дети, беременные женщины, а также пациенты с нарушениями функций печени и почек [8].

В настоящее время известны системы доставки тетрациклина на основе различных олиго- и полисахаридных матриц. Так, известны системы на основе хитозана: наночастицы и шарики, использующие лимонную кислоту в качестве кросс-линкера между цепями хитозана, загруженные тетрациклином [95]; система, содержащая тетрациклин и наночастицы оксида меди, включенные в полости микрочастиц хитозана, проявляющая больший антимикробный эффект по сравнению с эквивалентным количеством лекарственного препарата [96]; нанокомпозитные гидрогели, основанные на наночастицах хитозана с добавлением поливинилового спирта, которые могут быть использованы как перорально, так и трансдермально [97]; нановолокна типа ядро/оболочка на основе хитозана и поликапролактона (использующие хитозан в качестве ядра и поликапролактон в качестве оболочки, благодаря чему достигается адресная доставка заключенных внутрь лекарственных препаратов), содержащие внутри хитозанового ядра тетрациклин [98].

На основе производных целлюлозы создаются различные системы доставки тетрациклина: нанокompозитные гидрогелевые пленки для лечения кожных покровов [99]; композитные материалы на основе металлоорганических каркасных железосодержащих структур, демонстрирующих пролонгированное высвобождение за счет особой пористой структуры [100]; наночастицы на основе нанокристаллической целлюлозы в сочетании с поверхностно-активными веществами, способными улучшать адсорбционную емкость целлюлозной матрицы [101]; гидрогель на основе карбоксиметилцеллюлозы, обладающий откликом на изменение рН и температуры окружающей среды, что позволяет крайне точно производить высвобождение тетрациклина [102].

Схожее поведение демонстрируют и циклодекстрины: комплексы включения на основе анионного бета-циклодекстрина для долговременной защиты тканей организма от патогенов, содержащихся в окружающей среде, при использовании устройств, вводимых под кожу [103]; биоразлагаемый рН-чувствительный композит, созданный путем объединения привитого сополимера β -циклодекстрин-акриламида с силилированным бентонитом для контролируемого высвобождения гидрохлорида тетрациклина [104]; одностадийно синтезированные в криогенных условиях криогели бета-циклодекстрина (без какой-либо модификации бета-циклодекстрина перед сшиванием) для адресной доставки и высвобождения лекарственного препарата [105]; комплексы включения на основе гидроксипропил-бета-циклодекстрина с добавлением пуллулана для образования нановолокон, способных к крайне быстрому высвобождению связанного тетрациклина и полной биodeградации полисахаридной оболочки в условиях искусственной слюны [106]; новые гидрогели на основе целлюлозы (и карбоксиметилцеллюлозы) с бета-циклодекстрином (и карбоксиметил-бета-циклодекстрином) для адресной доставки лекарственных препаратов (в исследовании в качестве модельного соединения был использован тетрациклин) [107].

Стоит отметить, что все перечисленные выше исследования концентрировались на создании различных форм для доставки тетрациклина на основе полисахаридов: нановолокна, нанопленки, гидрогели, композитные материалы и т.д. При этом в литературе практически не встречается работ, в которых были бы получены комплексы полисахаридов с тетрациклином.

Заключение. Проведенный обзор литературы показал, что пектины могут использоваться как матрица для доставки лекарственных средств, выполнять структурирующие функции (особенно в гелях) и применяться в качестве вспомогательного компонента. На данный момент известны различные системы доставки лекарственных средств на основе пектиновых полисахаридов, позволяющие снизить ударную дозу и токсичность лекарственного средства и изменить профиль его высвобождения. Кроме того, нативные пектиновые полисахариды, будучи детоксикантами, способны выводить из организма тяжелые металлы и радионуклиды благодаря способности к комплексообразованию. Востребованными являются различные формы систем для пероральной доставки лекарственных средств на основе пектинов: таблетки, порошки, гранулы, наночастицы, нанокомпозиты и конъюгаты.

В последние годы широко используется химическая модификация пектиновых полисахаридов для образования трехмерных систем доставки низкомолекулярных лекарственных агентов. Однако комплексообразование пектиновых полисахаридов с НПВС и противомикробными препаратами мало изучено, поэтому целью данной работы стало изучение комплексообразования пектина с рядом нестероидных противовоспалительных препаратов (ацетилсалициловая кислота и ибупрофен) и некоторыми противомикробными препаратами (тетрациклин и амоксициллин), исследование физико-химических свойств полученных комплексов для создания новых лекарственных средств с контролируемым высвобождением, характеризующихся высокой биологической активностью и водорастворимостью, пролонгированным действием и пониженным ulcerогенным эффектом.

ГЛАВА 2. Комплексообразование пектиновых полисахаридов с нестероидными противовоспалительными и антимикробными препаратами. (обсуждение результатов)

В настоящей главе в связи с поставленной целью были исследованы закономерности комплексообразования пектина с НПВС (ибупрофеном и ацетилсалициловой кислотой) и противомикробными препаратами (тетрациклином и амоксициллином) и разработаны способы их получения.

2.1 Молекулярные комплексы пектиновых полисахаридов с НПВС

2.1.1 Молекулярные комплексы пектиновых полисахаридов с ибупрофеном

В рамках проведенных исследований получены новые водорастворимые комплексы (П/ИБП 1–8) пектина с нестероидным противовоспалительным препаратом “ибупрофен” и установлена их стехиометрия (таблица 1) [108]. Взаимодействие 2%-ого водного раствора пектина с растворами ибупрофена осуществлялось в водном этаноле при постоянном интенсивном перемешивании при температуре 55°C (схема 1).

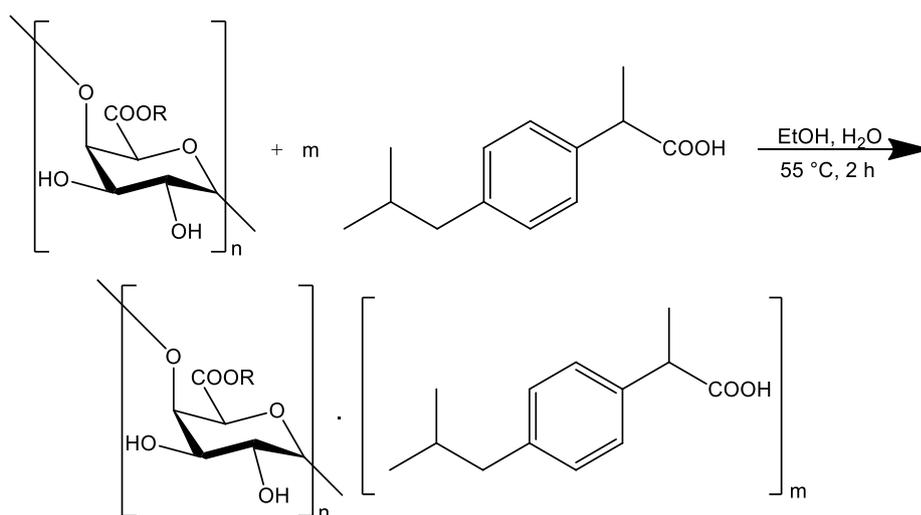


Схема 1 - Комплексы П/ИБП, R = H, CH₃; где n = 98; m = 2-15

Таблица 1 – Экспериментальные данные по синтезу комплексов пектина с ибупрофеном

Образец*	Масса ибупрофена, г	Масса комплекса, г	Масса ибупрофена в водном этаноле, г	Масса связанного ибупрофена, г	Связывание ибупрофена, %
Контроль (4 : 0)	0	-	-	-	-
1 (40 : 1)	0.100	3.332	0.0254	0.075	74.58
2 (20 : 1)	0.050	0.879	0.0241	0.044	87.95
3 (13.3 : 1)	0.300	3.033	0.134	0.166	55.23
4 (8 : 1)	0.500	3.463	0.134	0.367	73.32
5 (6.7 : 1)	0.600	3.458	0.122	0.478	79.71
6 (5.7 : 1)	0.700	4.009	0.098	0.602	85.94
7 (5 : 1)	0.800	3.642	0.193	0.607	75.86
8 (4.4 : 1)	0.900	3.570	0.190	0.710	78.90

*- в скобках дано массовое соотношение пектин : ибупрофен

Комплексы **1–8** из реакционной среды осаждали двойным объемом этилового спирта, центрифугировали, затем полученные осадки дважды промывали этанолом, чтобы отмыть несвязанный ибупрофен, затем комплексы высушивали и измельчали (диаметр не более 0.5 мм).

Известно, что большинство НПВС, в том числе и ибупрофен, практически нерастворимы в воде. Комплексообразование с пектиновыми полисахаридами позволяет получить их водные растворы, причем в зависимости от условий получения, растворимость изменяется в интервале 100.00% – 95.33% по сравнению с нативным пектином (таблица 2). Из данных, приведенных в таблице 2, следует, что образцы **1–8** соответствуют критерию растворимости, который составляет не менее 95%.

Таблица 2 – Характеристики растворов пектина и комплексов пектин : ибупрофен (С = 0.5%; H₂O)

Образец	Растворимость, %	pH (± 0.005)	$[\alpha]_D^{20}$	Кинематическая вязкость, мм ² /с (± 0.001)
Контроль	100.00	3.761	+188	3.450
П/ИБП 1	100.00	3.752	+180	3.579
П/ИБП 2	99.75	3.747	+177	3.663
П/ИБП 3	99.33	3.741	+173	4.176
П/ИБП 4	97.33	3.738	+164	3.370
П/ИБП 5	96.00	3.727	+160	3.337
П/ИБП 6	95.33	3.694	+151	3.274
П/ИБП 7	95.33	3.708	+155	3.394
П/ИБП 8	95.33	3.713	+156	3.418

Известно, что изменение кислотности является надежным критерием определения стехиометрии комплексов. В таблице 2 приведены значения pH 0.5%-ных растворов комплексов **1–8**. С увеличением концентрации ибупрофена в комплексе наблюдается изменение значений кислотности растворов, в комплексе **П/ИБП 6** при соотношении пектин : ибупрофен = 5.7 : 1 pH достигает минимального значения 3.694, далее наблюдается некоторое увеличение до значения pH 3.713. В данном случае можно предположить насыщение активных центров биополимера ибупрофеном. Водные растворы пектина и полученных соединений **П/ИБП 1–8** исследованы также с помощью методов вискозиметрии и поляриметрии (таблица 2). Так, изучена зависимость удельного оптического вращения, кинематической вязкости 0.5%-х растворов комплексов **1–8** (таблица 2). Методом поляриметрии показано, что изменение удельного оптического вращения в зависимости от изначального соотношения пектин – ибупрофен в реакционной среде носит нелинейный характер: в интервале от 40 : 1 до 5.7 : 1 наблюдается снижение удельного оптического вращения, в интервале от 5.7 : 1 до 4.4 : 1 – незначительное увеличение (таблица 2). Изменение кинематической вязкости растворов исследованных комплексов (таблица 2) носит также нелинейный характер. Увеличение содержания связанного в комплекс ибупрофена приводит к снижению

кинематической вязкости до значения 3.274 ± 0.001 мм²/с при соотношении пектин – ибупрофен = 5.7 : 1 (таблица 2).

Образование комплексов **1–8** подтверждено физико-химическими методами (УФ, ЯМР и ИК спектроскопия, порошковая дифрактография и метод динамического рассеяния света).

Водный раствор пектина (концентрация 0.05%) не имеет характеристических полос в УФ области спектра. УФ спектр раствора ибупрофена (растворитель – этанол) в области от 250 до 350 нм характеризуется полосами поглощения 264 ± 2 нм, 272 ± 2 нм и менее четко выраженным пиком при 258 ± 2 нм. В УФ спектрах комплексов пектина с ибупрофеном **1–8** наблюдается плечо (226 ± 2 нм), которое имеет максимальную интенсивность в спектрах комплексов **6–8** и отсутствует в УФ спектре чистого пектина (рисунок 12).

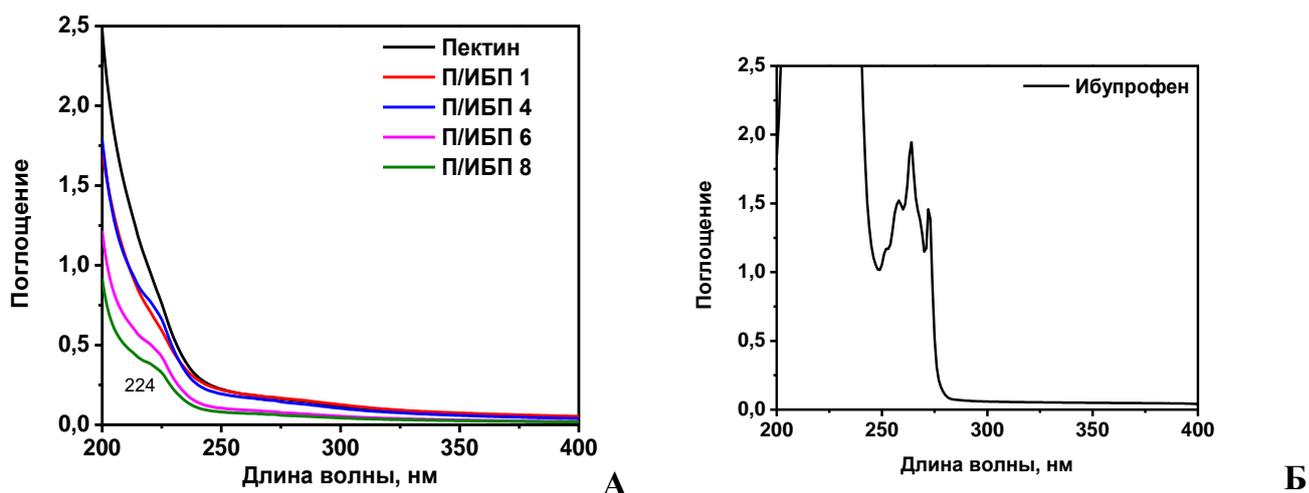


Рисунок 12 – УФ спектры водных растворов пектина и комплексов пектина с ибупрофеном (А) и раствора ибупрофена в этаноле (Б)

В ИК-спектре пектина (рисунок 13) присутствуют интенсивные полосы поглощения, характерные для валентных колебаний ОН-группы с максимумом при 3415 см⁻¹, колебаний группы, содержащей связи С—Н в области 2931 см⁻¹, валентных колебаний групп С=О в областях 1637 и 1746 см⁻¹, соответствующих карбоксильной и метоксикарбонильным группам соответственно. В области 1300 – 1400 см⁻¹ проявляются деформационные колебания СН-групп (1332 и 1371 см⁻¹). Интенсивные полосы в области 1148 – 1016 см⁻¹ отвечают валентным колебаниям С—С и С—О пиранозных колец. В области 700 – 900 см⁻¹ наблюдается ряд полос поглощения, характерных для

внеплоскостных колебаний связей С—Н. Пульсационные колебания пиранозных колец регистрируются в области 470–636 см^{-1} .

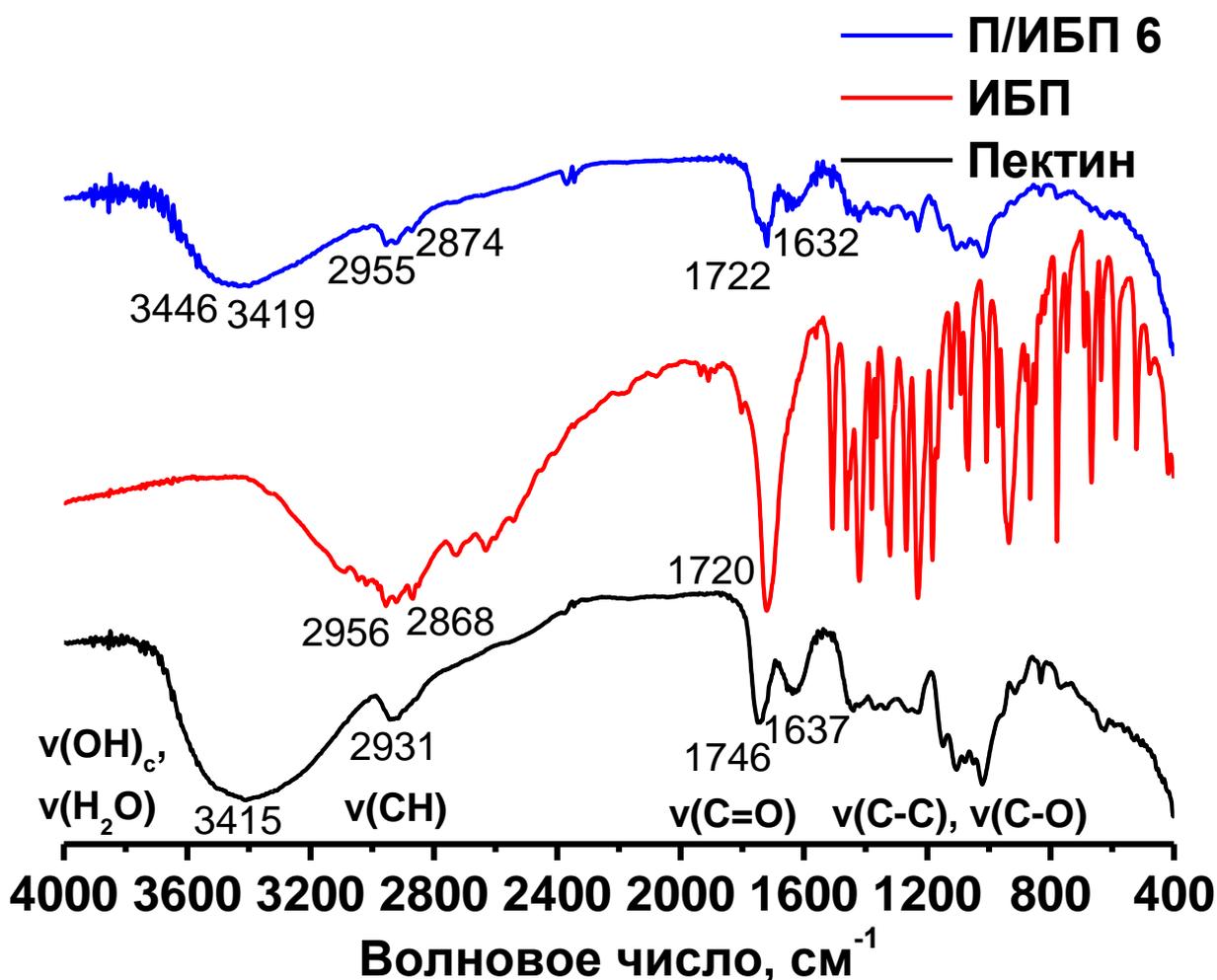


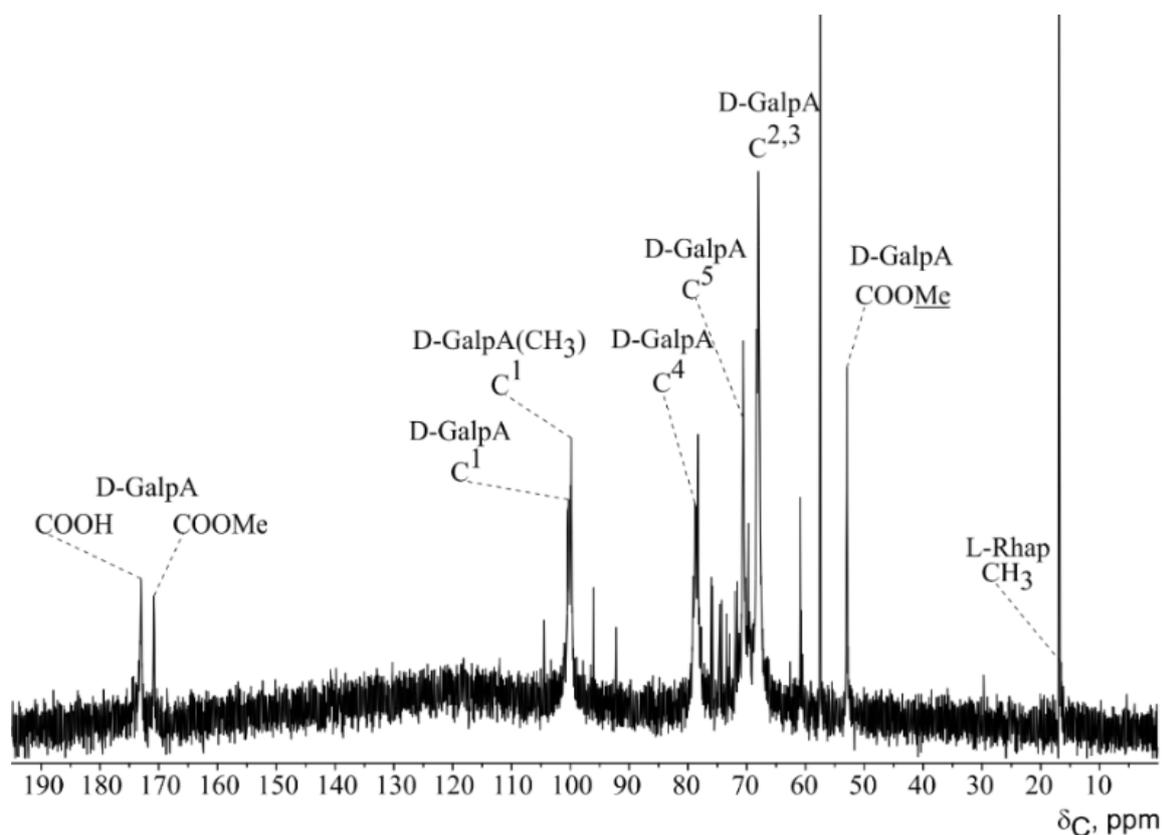
Рисунок 13 – ИК-спектры пектина, ИБП, комплекса П/ИБП 6

ИК-спектр ИБП в области частот от 4000 до 400 см^{-1} по положению полос поглощения соответствует спектру стандартного образца ибупрофена (ФС 2.1.0100.18).

В ИК-спектре комплекса П/ИБП 6 (рисунок 13) наблюдаются две полосы поглощения ОН-групп с максимумами 3419 и 3446 см^{-1} соответственно. Предположительно, одна из полос, отличающаяся от таковой для чистого пектина, сдвинулась в коротковолновую область из-за увеличения числа гидроксильных групп в составе соединения за счет связывания с ибупрофеном. Другая полоса, возможно, проявилась в спектре ввиду изменения количества воды, связанной комплексным соединением. Также в спектре хорошо заметен ряд полос поглощения валентных колебаний групп, содержащих СН-связи в области 2636–3047 см^{-1} , в отличие от

ИК-спектра пектина. Кроме того, в спектре присутствуют полосы поглощения валентных колебаний C=O групп в области 1632 и 1722 см⁻¹, сместившиеся в длинноволновую область по сравнению со спектром пектина. Вероятно, это связано с образованием водородных связей между гидроксильными группами биополимера и молекул ИБП. Деформационные колебания групп в области 1200–1500 см⁻¹, характерных для СН-связи, не претерпевают значительных изменений, в то время как полосы поглощения валентных колебаний C–C и C–O пиранозных колец в области 1150–1014 см⁻¹ демонстрируют небольшое смещение, которое, возможно, обусловлено образованием ионных связей между карбоксильными группами пектина и ибупрофена.

Образование пектиновых комплексов с НПВС было подтверждено также методом ¹³C ЯМР-спектроскопии. В качестве примера на рисунке 14 представлены ¹³C ЯМР-спектры цитрусового пектина, ибупрофена и комплекса пектина с ибупрофеном.



A

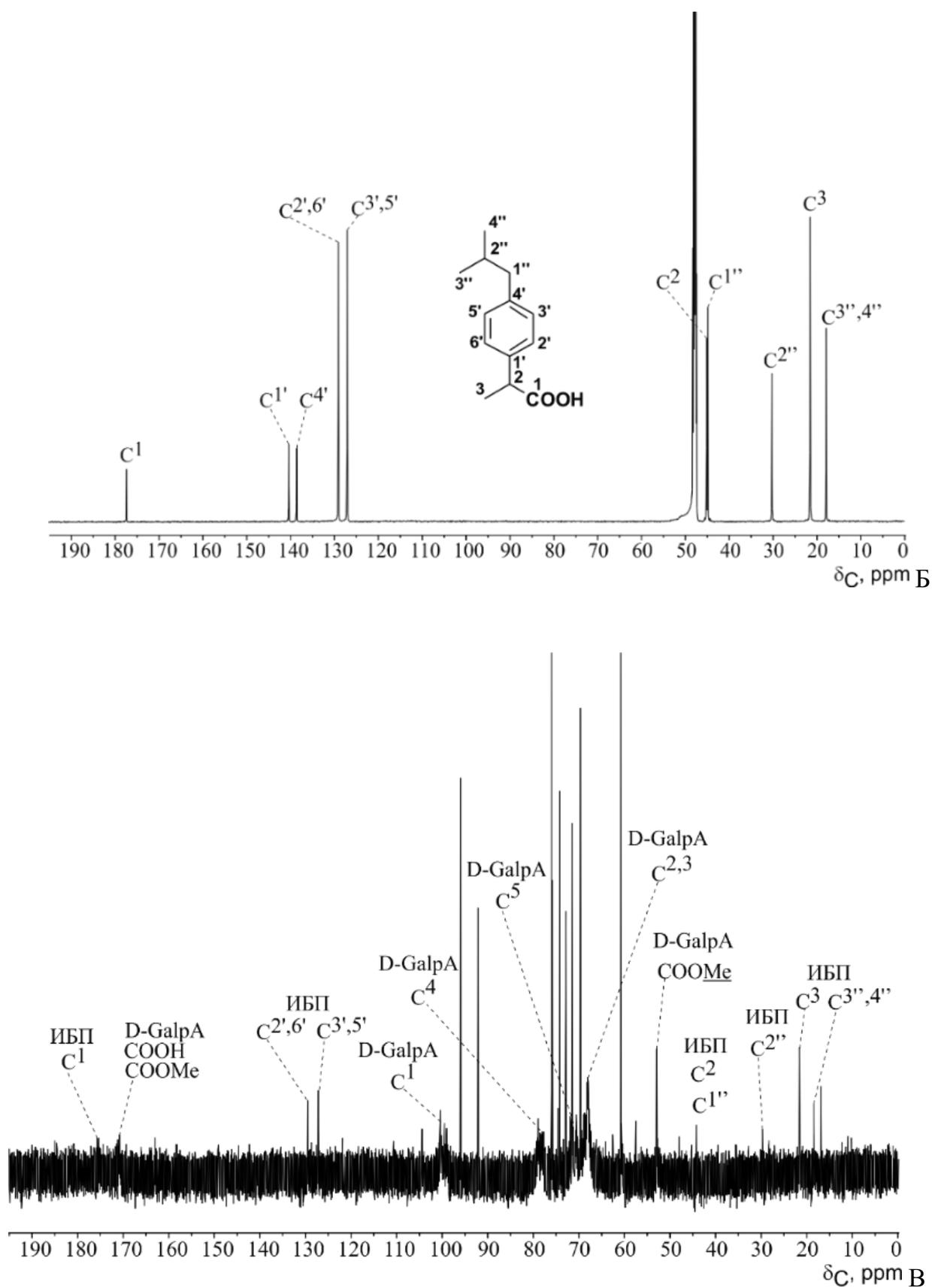


Рисунок 14 – ^{13}C ЯМР-спектры (150.9 МГц, D_2O) пектина (А), ибупрофена (Б) и комплекса П/ИБП 6 пектина с ибупрофеном (В)

В спектре пектина присутствуют сигналы (δ_C C¹99-100 м.д.; C^{2,3} 68 м.д.; C⁴ 80 м.д.; C⁵ 71 м.д.; C⁶170-173 м.д.), положение и вид которых соответствуют спектру α -1,4-D-галактопиранозилуронана (рисунок 14А). Среди других сигналов в ¹³C ЯМР-спектре пектина следует отметить сигналы –ОСН₃ групп при δ_C 53 м.д. Кроме того, легко идентифицируются сигналы в сильном поле при δ_C 16.5 м.д., принадлежащие метильной группе L-рамнопиранозы. Спектр ибупрофена (рисунок 14Б) характеризуется присутствием десяти сигналов, четыре из которых проявляются в области δ_C 125-140 м.д. и соответствуют резонансу углеродов ароматического кольца C^{1'-6'}, пять сильнополюсных сигналов в области δ_C 17-45 м.д. принадлежат метильным (C^{3,3'',4''}), метиленовому (C^{1''}) и метиновым (C^{2,2''}) группам, сигнал в области δ_C 175 м.д. принадлежит карбоксильной группе. Спектр комплекса пектина с ибупрофеном (рисунок 14В) в сравнении со спектрами чистых веществ отличается существенным уширением сигналов, относящихся к резонансу углеродов галактопиранозилуронидных фрагментов, в то время как углеродам нейтральных сахарных составляющих боковых цепей пектина соответствуют узкие интенсивные сигналы, сильно уширенным также оказывается сигнал, относящийся к резонансу углерода карбоксильной группы ибупрофена.

Для подтверждения комплексообразования пектина с ибупрофеном было проведено сравнительное исследование пектина, ибупрофена и их продуктов взаимодействия методом порошковой рентгеновской дифракции; полученные экспериментальные дифрактограммы исследованных образцов приведены на рисунке 15. Для дифрактограммы ибупрофена характерно наличие отчетливых интерференционных пиков, соответствующих его кристаллической фазе, для комплексов **1–4** в основном наблюдаются уширенные аморфные пики, причем их угловое положение и число отличаются от таковых для чистого пектина. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что при взаимодействии пектина с ибупрофеном не происходит выделения ибупрофена в исходную кристаллическую фазу в образцах **1–4, 6**, а наблюдается гомогенное распределение ибупрофена в массе пектина, что косвенно указывает на факт образования комплексов (рисунок 15).

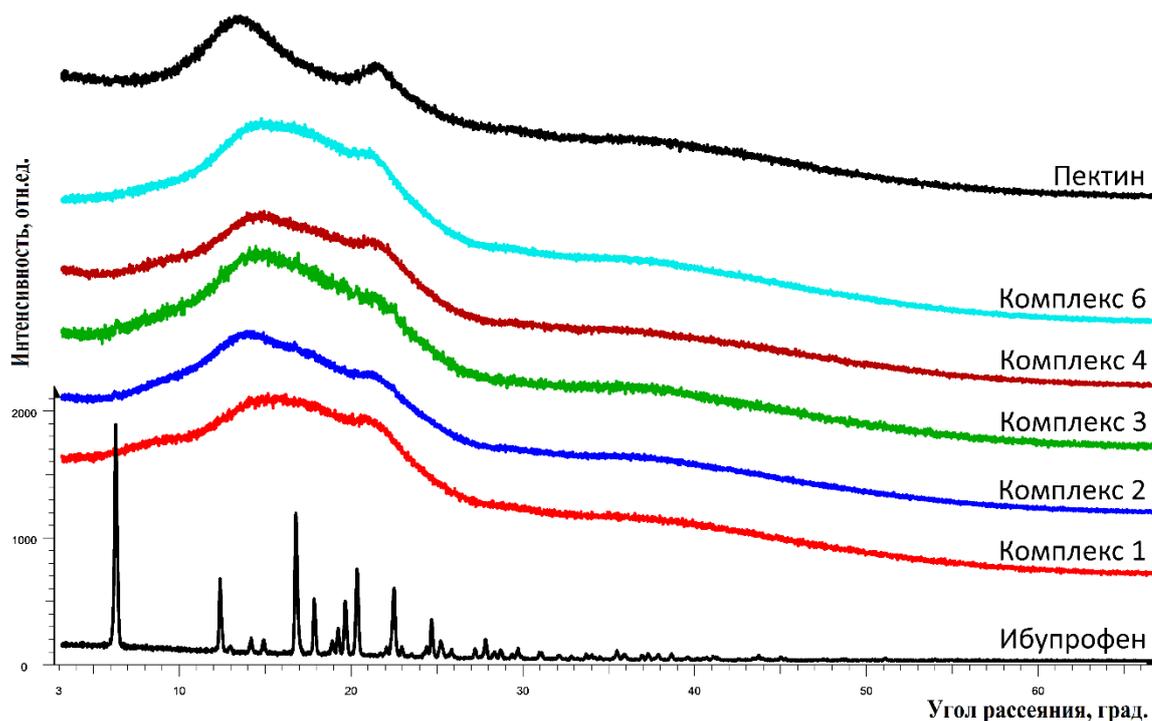


Рисунок 15 – Экспериментальные дифрактограммы для исследованных образцов пектина, ибупрофена и комплексов П/ИБП 1–4, 6, для наглядности кривые сдвинуты друг относительно друга по оси интенсивности

Методом динамического рассеяния света (ДРС) и микроэлектрофореза 0.1%-го водного раствора пектина (рисунок 16) выявлено мономодальное распределение частиц по размерам, аналогичное таковому в работе [13]. Диаметр частиц в максимуме кривой распределения равен 615 нм, а ζ -потенциал равен -25.80 мВ. В 0.1%-м растворе ибупрофена зафиксированы частицы со средним гидродинамическим диаметром 295 нм, ζ -потенциал которых равен -39 мВ (рисунок 16).

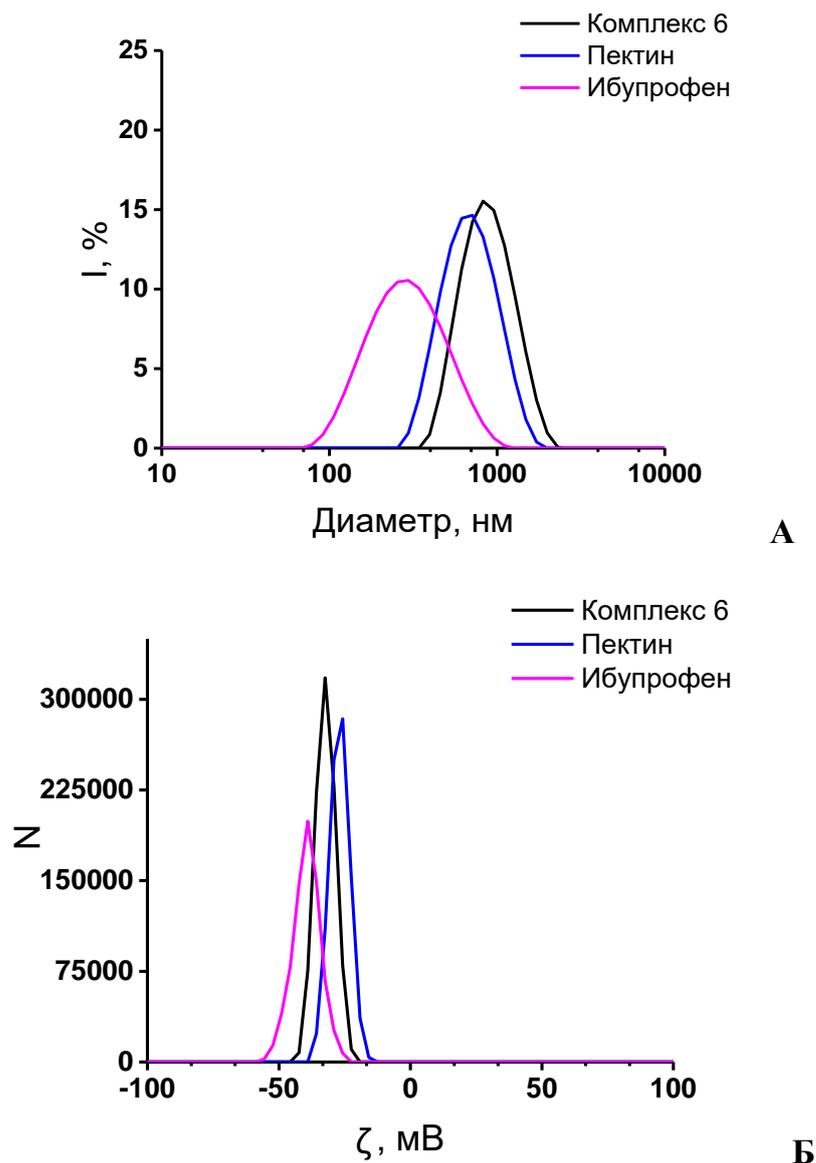


Рисунок 16 – Распределение частиц по размеру (А) и ζ -потенциалу (Б) в системах пектин – ибупрофен

Исследование 0.1% растворов комплексов пектин – ибупрофен методом ДСР, показавшее изменение их ζ -потенциала и среднего гидродинамического диаметра по сравнению с исходными соединениями, косвенно подтверждает, что при взаимодействии пектина с ибупрофеном наблюдается комплексообразование (таблица 3). Для примера приведено распределение частиц по размерам для комплекса 6 (рисунок 16). Показано, что средний гидродинамический диаметр частиц составляет 825 нм, ζ -потенциал которых равен -32 мВ.

Таблица 3 – Средний гидродинамический диаметр и ζ -потенциал пектина, ибупрофена и их комплексов **4, 6, 8**

Образец	D, нм	ζ -потенциал, мВ
Пектин	615.14	-25.78
П/ИБП 4	938.20	-31.00
П/ИБП 6	824.99	-32.41
П/ИБП 8	615.14	-32.41
Ибупрофен	295.31	-39.04

Таким образом, методами УФ-, ЯМР- и ИК- спектроскопии, порошковой дифрактографии и ДСР доказано образование водорастворимых комплексов пектина с ибупрофеном **1-8** и найдено оптимальное массовое соотношение исходных соединений, равное 5.7 : 1, при котором связывается максимальное количество ибупрофена (на один моль пектина 14 молей ибупрофена). Полученные результаты в дальнейшем дают возможность создать новую лекарственную форму препарата ибупрофен, отличающуюся повышенной растворимостью и биодоступностью.

2.1.2 Молекулярные комплексы пектиновых полисахаридов с АСК

Согласно поставленной цели получены комплексы пектина с нестероидным противовоспалительным препаратом аспирин, схема получения комплексов пектина с АСК (схема 2) приведена ниже. Полученные соединения исследованы с помощью физико-химических методов (ИК- и УФ- спектроскопия, ДСР и рентгеновская порошковая дифрактометрия) [109].

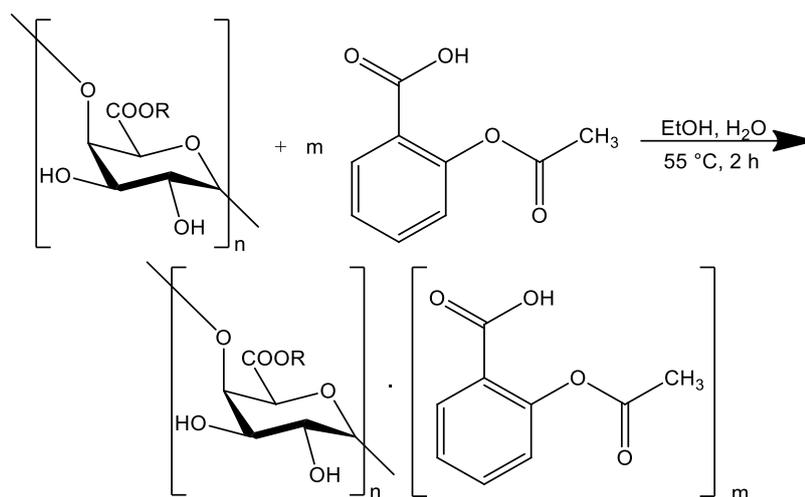


Схема 2 – Комплексы П/АСК, R = H, CH₃; n = 98, m = 2-16

Для установления стехиометрии и определения максимального связанного количества аспирина проведена серия экспериментов, в которых массовое соотношение пектина и лекарственного препарата варьируется в пределах 40 : 1 - 2 : 1 (таблица 4).

Таблица 4 – Характеристические данные к синтезу комплексов П/АСК

Образец	Соотношение массы пектина к массе ацетилсалициловой кислоты	Количество связанного аспирина, масс. %
Контроль	-	-
П/АСК 1	40.0 : 1	92.82
П/АСК 2	13.3:1	70.99
П/АСК 3	8.0 : 1	62.69
П/АСК 4	5.3 : 1	60.00
П/АСК 5	4.0 : 1	61.38
П/АСК 6	2.7 : 1	55.16
П/АСК 7	2.0 : 1	54.23

Контроль за комплексообразованием пектина с АСК проводился методом ИК- спектроскопии. На рисунке 17 в качестве примера представлены ИК-спектры пектина, АСК и комплекса **П/АСК 5**.

В ИК-спектре пектина (рисунок 17) присутствуют интенсивные полосы поглощения, характерные для валентных колебаний ОН-группы с максимумом 3415 см^{-1} , колебаний группы, содержащей СН-связи в области 2931 см^{-1} , валентных колебаний С=О групп в области 1637 и 1746 см^{-1} , соответствующим их ионной и сложноэфирной форме, соответственно. В области $1300\text{--}1400\text{ см}^{-1}$ проявляются деформационные колебания СН-групп (1332 и 1371 см^{-1}). Интенсивная группа полос в области $1148\text{--}1016\text{ см}^{-1}$ принадлежит валентным колебаниям С–С и С–О пиранозных колец. В области $700\text{--}900\text{ см}^{-1}$ наблюдается ряд полос поглощения, характерных для внеплоскостных колебаний связей СН. Пульсационные колебания пиранозных колец наблюдаются в области $470\text{--}636\text{ см}^{-1}$.

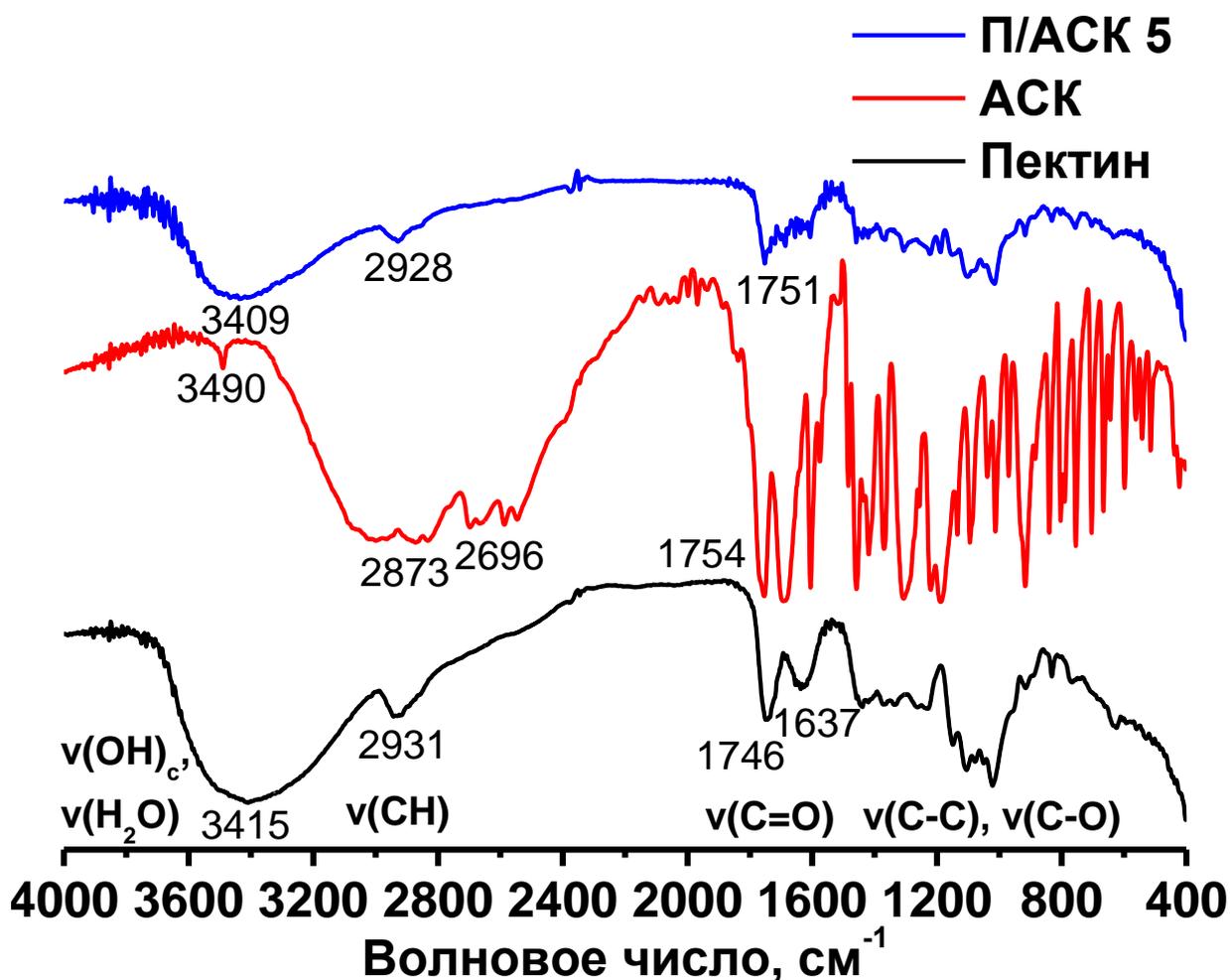


Рисунок 17 – ИК-спектры пектина, АСК, комплекса П/АСК 5

ИК-спектр АСК в области частот от 4000 до 400 см^{-1} по положению полос поглощения соответствует спектру стандартного образца ацетилсалициловой кислоты

согласно приложению к ФС.2.1.0006.15. В ИК-спектре присутствуют полосы поглощения валентных колебаний, характерные для ОН-групп (3490 см^{-1}), СН- групп ($2500 - 3000\text{ см}^{-1}$) и С=О групп (1754 см^{-1}) ацетилсалициловой кислоты.

В ИК-спектре комплекса П/АСК **5** (рисунок 17) наблюдается полоса поглощения с максимумом 3409 см^{-1} , отличающаяся от чистого пектина, что можно объяснить увеличением числа гидроксильных групп в составе соединения за счет связывания с АСК. В отличие от ИК-спектра пектина, наблюдается смещение полосы 2931 см^{-1} в длинноволновую область. Кроме того, в спектре комплекса проявляются валентные колебания групп, содержащих СН-связи, в области 2703 и 2588 см^{-1} . В свою очередь, в спектре присутствуют полосы поглощения, характерные для валентных колебаний С=О групп в области 1693 и 1754 см^{-1} , отличающиеся от таковых в спектре пектиновой макромолекулы. Вероятно, это связано с образованием водородных связей между ними и гидроксильными группами молекул АСК. Деформационные колебания групп в области $1200-1500\text{ см}^{-1}$, характерные для СН-связи, не претерпевают значительных изменений, в то время как полосы поглощения валентных колебаний С-С и С-О пиранозных колец в области $1146-1014\text{ см}^{-1}$ демонстрируют небольшое смещение, которое, возможно, обусловлено образованием ионных связей между карбоксильными группами пектина и АСК.

Проведен сравнительный анализ УФ-спектров исходных пектина и АСК, а также целевого продукта. Водный раствор пектина не имеет характеристических полос в УФ-области спектра (рисунок 18). УФ-спектр водного раствора АСК содержит две полосы поглощения при длине волны 225 нм и 275 нм . При взаимодействии АСК с пектином в водном растворе наблюдается длинноволновый сдвиг второй полосы поглощения до $\lambda 297\text{ нм}$ (рисунок 18). При этом положение первого максимума практически не меняется, но высота (интенсивность) уменьшается. Такой характер изменения УФ-спектра свидетельствует о возможном образовании комплекса пектин – АСК.

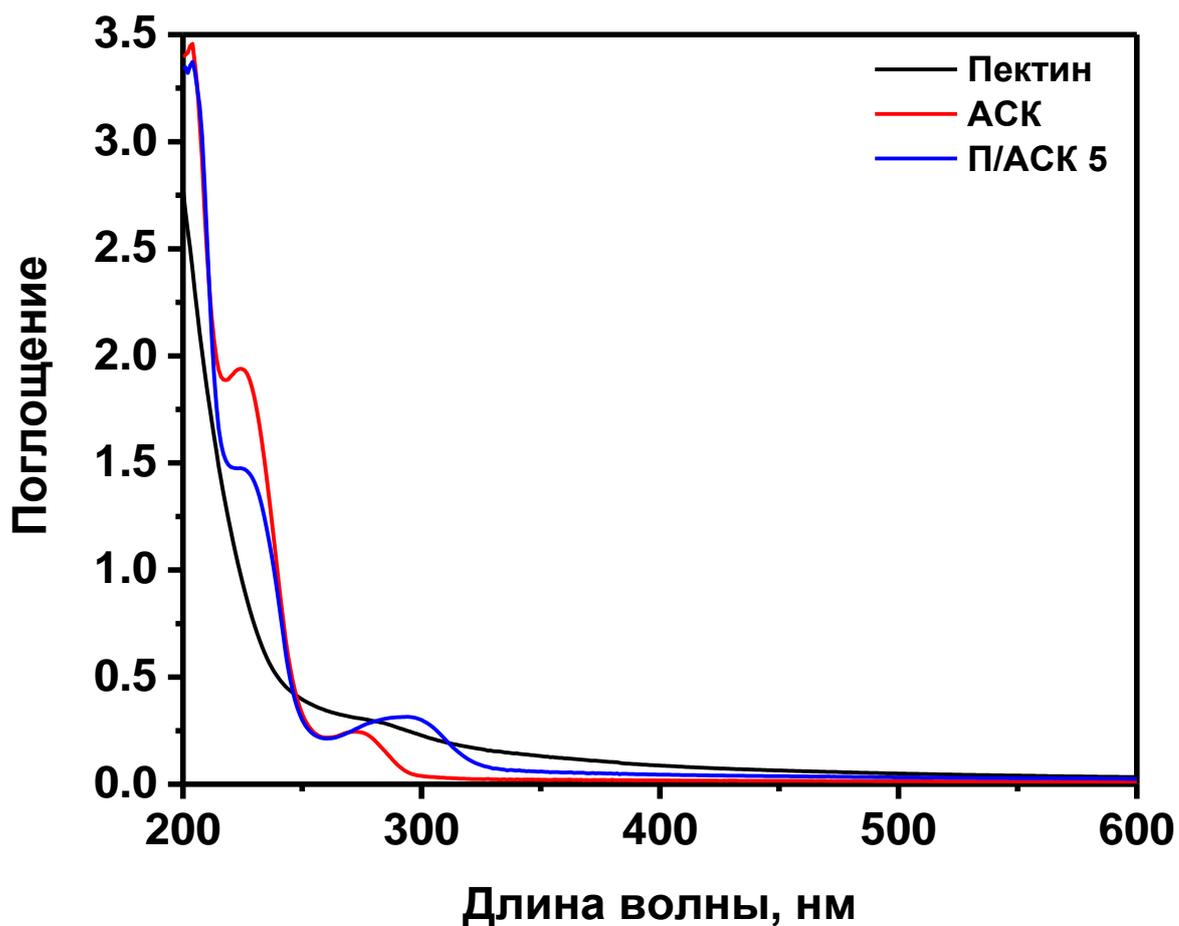


Рисунок 18 – УФ-спектры пектина, АСК и комплекса П/АСК 5

На рисунке 19 представлены микрофотографии образцов пектина (А), АСК (Б) и комплекса П/АСК 5 (В), полученные на электронном микроскопе НІТАСНІ ТМ–1000. Анализ микрофотографий демонстрирует морфологические изменения поверхности пектиновой матрицы в составе комплекса. Из рисунка 19 видно, что пектин представляет собой аморфный порошок, АСК демонстрирует кристаллическую структуру, а полученные комплексы П/АСК имеют схожий с пектином характер поверхности (аморфный порошок), что позволяет сделать предположение о равномерном распределении АСК в объеме пектина, что косвенно свидетельствует о комплексообразовании.

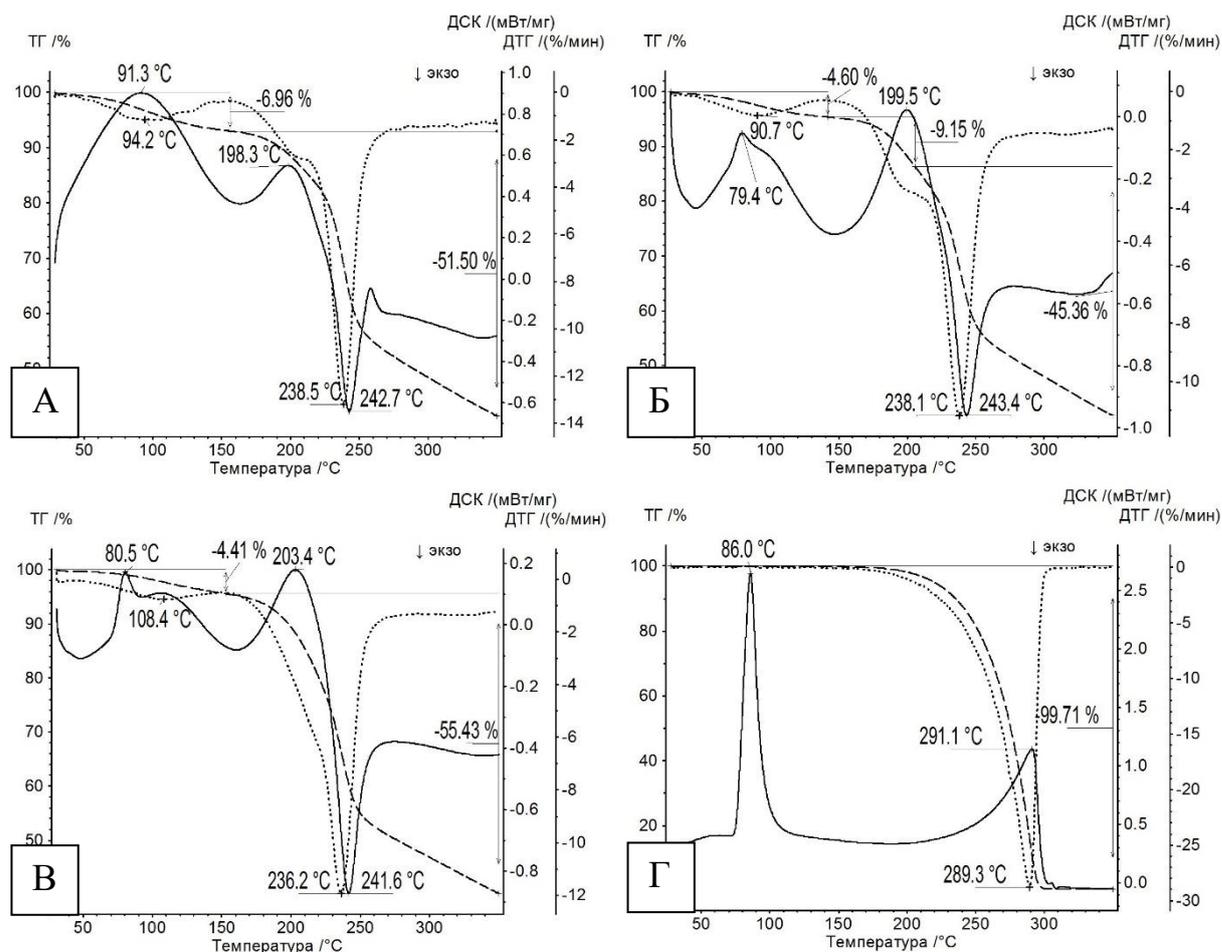


Рисунок 20 – ТГ/ДСК данные для пектина, ибупрофена и комплексов пектина с ибупрофеном: А – пектин, Б – комплекс П/ИБП 4, В – комплекс П/ИБП 6, Г – ибупрофен. Здесь и далее: ДСК – сплошная линия, ТГ – штриховая, ДТГ – пунктирная

Таблица 5 – ТГ/ДСК данные для пектина, ибупрофена и комплексов пектина с ибупрофеном

Образец	Стадии потери массы								
	1			2			3		
	ДТГ, °С	ΔТГ, %	ДСК, °С	ДТГ, °С	ΔТГ, %	ДСК, °С	ДТГ, °С	ΔТГ, %	ДСК, °С
Пектин	94.2	6.9	91.3	203.4	7.4	198.3	238.5	51.50	242.7
П/ИБП 4	90.7	4.60	79.4	-	9.15	199.5	238.1	45.36	243.4
П/ИБП 6	108.4	4.41	80.5	-	-	203.4	236.2	55.43	241.6
П/ИБП 8	106.2	5.17	79.3	209.8	13.39	203.2	236.7	40.41	241.8
Ибупрофен	-	-	-	-	-	-	289.3	99.7	291.1

Анализ полученных результатов показывает, что кривые ТГ/ДСК пектина и комплексов пектина с ибупрофеном, полученных взаимодействием при различных соотношениях, имеют схожий характер: исходный пектин и комплексы с различным содержанием ибупрофена имеют по три стадии потери массы с идентичными характеристичными температурными пиками на кривой ДТГ и соответствующими им пиками на кривой ДСК (рисунок 20, таблица 5).

ТГ/ДСК данные для всех комплексов пектина с АСК, пектина и АСК приведены в таблице 6.

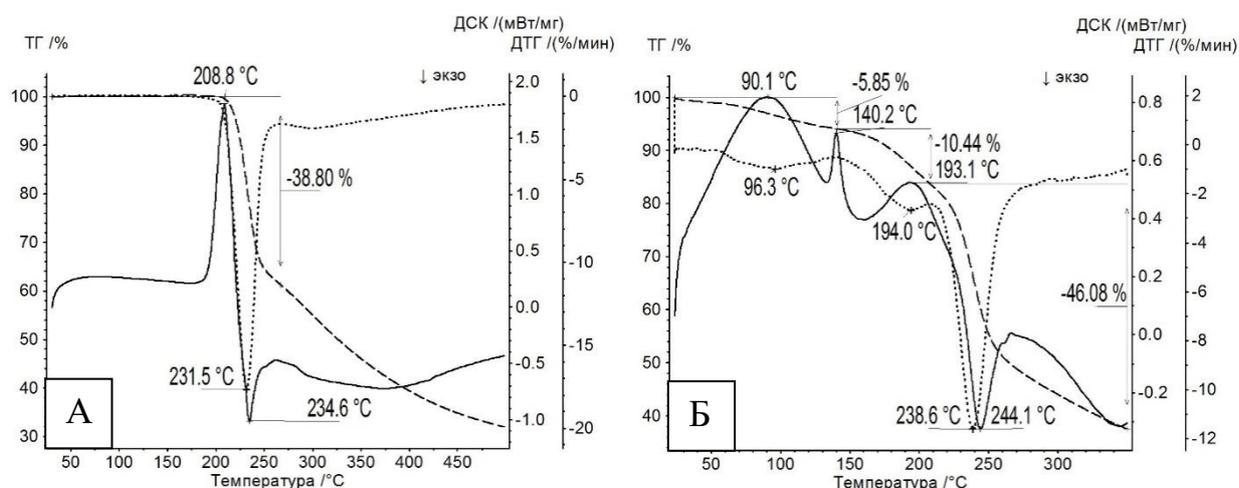


Рисунок 21 – ТГ/ДСК данные для АСК (А) и комплекса П/АСК 5 (Б)

Кривые ТГ/ДСК образцов комплексов и пектина (см. таблицу 6) демонстрируют также три стадии потери массы. Согласно соответствующим ИК-Фурье спектрам газообразных продуктов на первой и второй стадии происходит испарение молекул воды в диапазоне температур 91-101°С с потерей массы ~5.3-7.5%. Третья стадия, соответствующая декарбосилированию полисахарида, сопровождается потерей массы ~41.7-54.2% в интервале температур 241.0-244.5°С.

Таблица 6 – ТГ/ДСК данные для пектина, АСК и комплексов пектина с АСК

Образец	Стадии потери массы								
	1			2			3		
	ДТГ, °С	ΔТГ, %	ДСК, °С	ДТГ, °С	ΔТГ, %	ДСК, °С	ДТГ, °С	ΔТГ, %	ДСК, °С
Пектин	94.2	7.0	91.3	-	-	-	238.5	51.5	242.7
П/АСК 1	91.9	7.2	85.7	-	-	-	240.7	53.2	245.7
П/АСК 2	99.6	7.5	91.2	-	-	-	239.7	53.6	244.4
П/АСК 3	101.0	6.8	97.1	-	-	-	237.8	54.2	243.1
П/АСК 4	100.4	5.6	99.0	-	8.5	195.9	238.4	46.52	243.4
П/АСК 5	96.3	5.9	90.1	194.0	10.4	193.1	238.6	46.1	241.1
П/АСК 6	95.3	5.6	88.5	198.9	15.1	193.2	238.1	42.3	243.9
П/АСК 7	95.6	5.3	84.4	195.3	16.6	193.3	238.9	41.7	244.5
АСК	-	-	-	-	-	-	231.5	38.8	234.6

Таким образом, методом ТГ/ДСК в сравнительном аспекте исследовано термическое разложение пектина и синтезированных комплексов с ибупрофеном и ацетилсалициловой кислотой. Дальнейшее изучение кинетики высвобождения лекарственных средств (ибупрофен, аспирин), связанных в комплекс с пектином, обусловлено необходимостью определения транспортных свойств пектиновой матрицы.

2.1.4 Биологическая активность молекулярных комплексов пектина с НПВС

В результате проведенных исследований острой токсичности ибупрофена и комплекса **П/ИБП 6** их токсичная доза не определена, так как в исследованных группах остались живы все мыши. Учитывая, что летальная доза комплекса выше 5000 мг/кг, его можно отнести к VI классу («относительно безвредных») веществ.

Оценка ульцерогенного действия. Было исследовано ульцерогенное действие комплекса **П/ИБП 6**, а также пектина и ибупрофена в эквивалентной дозе, при однократном внутрижелудочном введении крысам суспензий на твине 80. Результаты оценки ульцерогенного эффекта данных веществ представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Ульцерогенное действие исследуемых веществ

Группа	Степень повреждения, баллы
Контроль (твин 80)	0.17±0.12
Ибупрофен	1.42±0.56
Пектин	0.25±0.12
П/ИБП 6	1.08±0.33

Из таблицы 7 видно, что ульцерогенное действие в группе крыс, получавших комплекс ибупрофена и пектина, проявилось в меньшей степени, чем у животных, получавших субстанцию ибупрофена.

Исследование противовоспалительных свойств. Острую воспалительную реакцию (отек) воспроизводили субплантарным (под подошвенный апоневроз) введением 0.1 мл 2%-го раствора формалина модели «Формалиновый отек лапы у крыс». Противовоспалительный эффект **П/ИБП 6**, а также пектина и ибупрофена в эквивалентной дозе, оцениваемый по уменьшению отека, выраженный в процентах к контролю, представлен в таблице 8.

Таблица 8 – Противовоспалительный эффект исследуемых веществ

Группа	% к контролю
Ибупрофен	10.1
Пектин	17.2
П/ИБП 6	25.1

На основании полученных результатов показано, что наиболее высокий противовоспалительный эффект отмечался в группе крыс, получавших комплекс **П/ИБП 6**. Следует отметить, что чистый цитрусовый пектин также проявил высокую противовоспалительную активность.

Исследование фармакокинетики комплекса пектина с ибупрофеном при однократном пероральном введении на лабораторных животных. Результаты сравнительного изучения концентрации ибупрофена в плазме крови белых крыс на фоне однократного внутрижелудочного введения ИБП и **П/ИБП 6** в дозе 1000 мг/кг в различные временные периоды (1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 24 ч) представлены на рисунке 22.

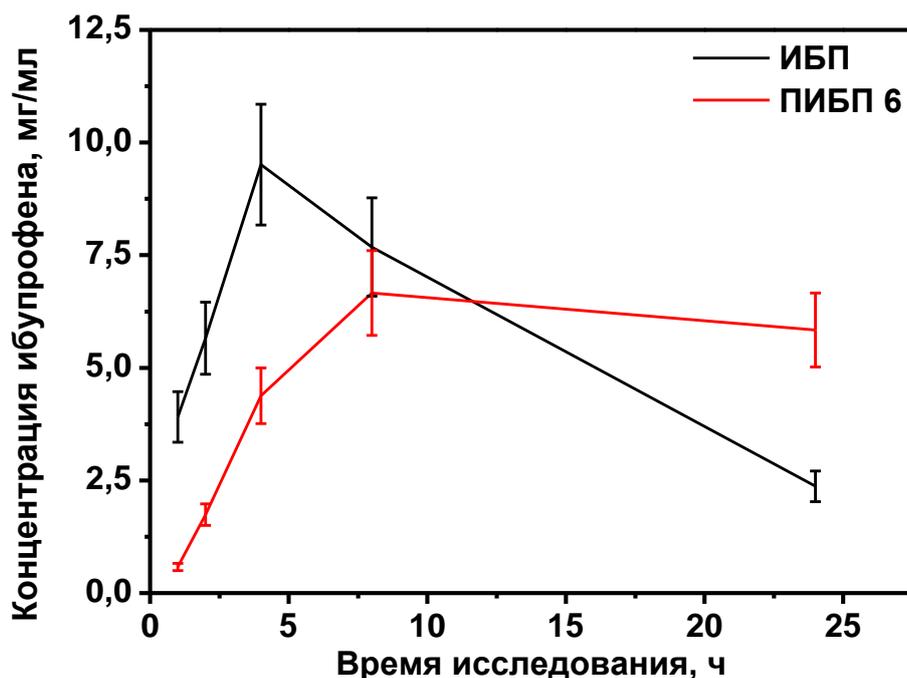


Рисунок 22 – Усреднённые фармакокинетические кривые ибупрофена в плазме крови белых крыс на фоне однократного внутрижелудочного введения ИБП и ПИБП 6 в дозе 1000 мг/кг массы тела

Усреднённые фармакокинетические параметры изучаемых препаратов белых крыс на фоне однократного внутрижелудочного введения ИБП и ПИБП 6 в дозе 1000 мг/кг массы тела представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Усреднённые фармакокинетические параметры изучаемых средств

Параметр	Группа животных	
	1 (ИБП)	2 (ПИБП 6)
C_{\max} , МКГ/МЛ	9510.0	6660.0
T_{\max} , ч	4.0	8.0
$T_{1/2}$, ч	16.8	не уст.
$AUC_{(0-24)}$, МГ·Ч/МЛ	13.5	12.6
f , %	100.0	89.3

C_{\max} – максимальная концентрация; T_{\max} – время достижения максимальной концентрации; $T_{1/2}$ – период полувыведения; $AUC_{(0-24)}$ – общее количество лекарственного препарата, высвобожденного за 24 ч; f – относительная биодоступность.

Как следует из данных, представленных в таблице 9 и на рисунке 22, кинетические кривые и параметры достаточно сильно отличаются от таковых при исследовании фармсустанции ибупрофена и его комплекса с пектином. Это связано с тем, что в настоящем исследовании в качестве тест-систем были взяты лабораторные животные (крысы) и то, что дозировка была многократно превышена, т.к. основной задачей было сравнительное изучение фармакокинетики ИБП и **П/ИБП 6** и определение основных различий и тенденций для последующих, подтверждающих и более детальных исследований.

Максимальная концентрация ИБП, достигнутая за 24 ч исследования, составила 9510.0 мкг/мл, а **П/ИБП 6** – 6660.0 мкг/мл, что на 30% ниже, чем для ИБП. Время достижения максимальной концентрации за 24 ч было в два раза дольше при введении комплекса пектина с ибупрофеном, что в целом объяснимо, т.к. препараты отличаются лекарственной формой, высвобождение ибупрофена из матрицы препарата происходит медленнее. Период полувыведения у ИБП составил 16.8 ч, но период полувыведения **П/ИБП 6** установить не удалось, т.к. длительность исследования в 24 часа является недостаточной для определения периода полувыведения **П/ИБП 6**. Так, концентрация ибупрофена при высвобождении из **П/ИБП 6** в конце исследования все еще оставалась на достаточно высоком уровне. В то же время, эти данные свидетельствуют о перспективе использования **П/ИБП 6** как пролонгированного препарата. Относительная биодоступность (f , %) ибупрофена из **П/ИБП 6** по сравнению с ИБП, взятым за 100%, составила 89.3%. Это достаточно высокий показатель, а с учетом того, что концентрация ибупрофена при введении **П/ИБП 6** нарастает постепенно и удерживается более длительное время, вероятно, при увеличении длительности исследования (> 24 ч), биодоступность ибупрофена из пролонгированного препарата **П/ИБП 6** будет выше.

Результаты исследования биологической активности молекулярных комплексов П/АСК. Оценка противовоспалительной активности [110]. В результате оценки воспалительной реакции и противовоспалительной активности АСК и комплекса **П/АСК 5** было показано, что через 2 часа после введения каррагинана увеличился объем лапы (в контрольной группе на 26.7%) и уменьшилось время наступления боли в тесте «горячая пластина» (в контрольной группе на 10%), что связано с развитием воспалительной реакции. Через 2 часа после введения каррагинана в опытных группах, которым вводили 40 мг/кг АСК и 400 мг/кг **П/АСК 5**, выраженность отека была

статистически достоверно меньше, чем в контроле. Однако на ощущение боли через 2 часа исследуемые препараты не оказали достоверного эффекта.

Через 5 часов во всех группах, которым вводили АСК (10, 20 и 40 мг/кг), наблюдали выраженное уменьшение отека. Объем лапы восстанавливался и лишь на 4-8% превышал исходные значения. Различия с контролем во всех трех группах, получавших АСК, были статистически достоверны при $p < 0.05$. При введении **П/АСК 5** аналогичный эффект наблюдали лишь при максимальной дозе – 400 мг/кг. На проявление боли АСК и **П/АСК 5** в эквимолярных дозах 20, 40 мг/кг и 200, 400 мг/кг соответственно, оказали равнозначное влияние, увеличивая время появления боли в тесте «горячая пластина». Выявленные различия с контрольной группой были статистически достоверны в группах, которым вводили 40 мг/кг АСК, а также 200 и 400 мг/кг **П/АСК 5**.

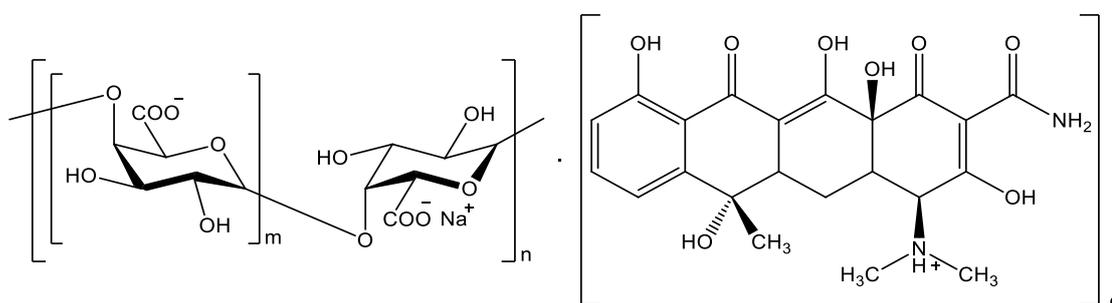
2.2 Комплексы полигалактуроната натрия с противомикробными препаратами

2.2.1 Комплексы полигалактуроната натрия с гидрохлоридом тетрациклина

Проведена серия экспериментов, позволившая исследовать закономерности комплексообразования цитрусового пектина в зависимости от концентрации тетрациклина, значения рН исходного раствора, а также определить характеристики полученных продуктов. В результате взаимодействия 2%-ого водного раствора полигалактуроната натрия (ПГNa) с растворами гидрохлорида тетрациклина ($ТС \cdot HCl$) в водном этаноле (при варьировании соотношения ПГNa и $ТС \cdot HCl$, таблица 10) синтезированы комплексы **1–5** [111]. Исходный водный раствор ПГNa был предварительно получен обработкой 2%-ого раствора цитрусового пектина 0.625 М раствором NaOH.

Таблица 10 – Характеристические данные к синтезу комплексов **1–5**

Образец	Массовое соотношение ПГNa и ТС·HCl	Количество связанного тетрациклина (± 0.01), %
ПГNa/ТС 1	8.0:1.0	4.74
ПГNa/ТС 2	5.7:1.0	5.56
ПГNa/ТС 3	4.4:1.0	5.81
ПГNa/ТС 4	3.6:1.0	6.56
ПГNa/ТС 5	3.1:1.0	6.68

**Схема 3** - Комплексы ПГNa/ТС

Впоследствии из реакционной среды продукты осаждали этанолом, центрифугировали их и дополнительно промывали этиловым спиртом для очистки комплексов **1–5** от физически сорбированного тетрациклина, высушивали и измельчали. Далее охарактеризовали 0.5%-е водные растворы полученных комплексов и ПГNa (таблица 11).

Показано, что комплексообразование ПГNa с ТС·HCl позволяет получить водорастворимые продукты **1–5**, причем в зависимости от условий получения, растворимость изменяется в интервале 96.00–99.33% (таблица 11). Из данных, приведенных в таблице 11, следует, что образцы **1–5** соответствуют критерию растворимости, который составляет не менее 95%.

Таблица 11 – Экспериментальные данные по получению комплексов пектина с тетрациклином

Образец	Растворимость, % (± 0.01)	pH (± 0.005)	$[\alpha]_D^{20}$ (<i>c</i> 0.5; H ₂ O)	Кинематическая вязкость, мм ² /с (± 0.001)
ПГNa	99.33	7.004	+189	1.479
ПГNa/ТС 1	99.33	5.647	+183	1.458
ПГNa/ТС 2	99.33	5.293	+187	1.452
ПГNa/ТС 3	99.33	5.286	+165	1.462
ПГNa/ТС 4	99.33	5.125	+163	1.464
ПГNa/ТС 5	96.00	5.032	+159	1.456
ТС·HCl	100.00	2.779	-266	0.994

Известно, что изменение кислотности является надежным критерием определения стехиометрии комплексов. С увеличением концентрации тетрациклина в комплексах ПГNa/ТС (таблица 10, таблица 11) наблюдается уменьшение значения pH 0.5%-х растворов, и в образце **5** pH достигает минимального значения 5.032.

Водные растворы ПГNa и **ПГNa/ТС 1–5** исследованы также с помощью методов вискозиметрии и поляриметрии (таблица 11). Так, методом поляриметрии показано, что величина удельного оптического вращения для комплексов **2–5** в целом уменьшается при увеличении доли тетрациклина в составе комплексов.

Исследование кинематической вязкости растворов полученных комплексов (таблица 11) показывает, что значения меняются в пределах 1.425–1.473 мм²/с. Следует отметить, что кинематическая вязкость комплексов **3** и **4** практически одинакова, но несколько выше, чем у комплекса **5**. Вместе с тем комплекс **4**, как и комплексы **1–3**, имеет высокую растворимость (99.33%), в отличие от комплекса **5**, имеющего растворимость 96.00%.

Образование **ПГNa/ТС 1–5** подтверждено физико-химическими методами (ИК, УФ и ЯМР спектроскопия, рентгеновская порошковая дифрактометрия, сканирующая электронная микроскопия, термогравиметрический анализ и метод динамического рассеяния света).

Методом ИК-спектроскопии (рисунок 23) показано, что при комплексообразовании с полигалактуронатом натрия наблюдается последовательное смещение полосы поглощения ОН-групп с максимумами при 3428–3437 см^{-1} , что можно объяснить увеличением числа гидроксильных групп при связывании с тетрациклином. Кроме того, в спектрах также присутствуют полосы поглощения валентных колебаний групп С=О в областях 1609–1616 см^{-1} . Вероятно, это связано с образованием водородных связей между карбоксильными группами полимера и молекулами тетрациклина. Деформационные колебания групп в области 1200–1500 см^{-1} , характерные для связи С–Н, демонстрируют небольшое смещение, которое, возможно, обусловлено образованием ионных связей между карбоксильными группами пектата натрия и тетрациклина, в то время как полосы поглощения валентных колебаний С–С и С–О пиранозных колец в области 1150–1000 см^{-1} не претерпевают значительных изменений, равно как и низкочастотные колебания пиранозного цикла.

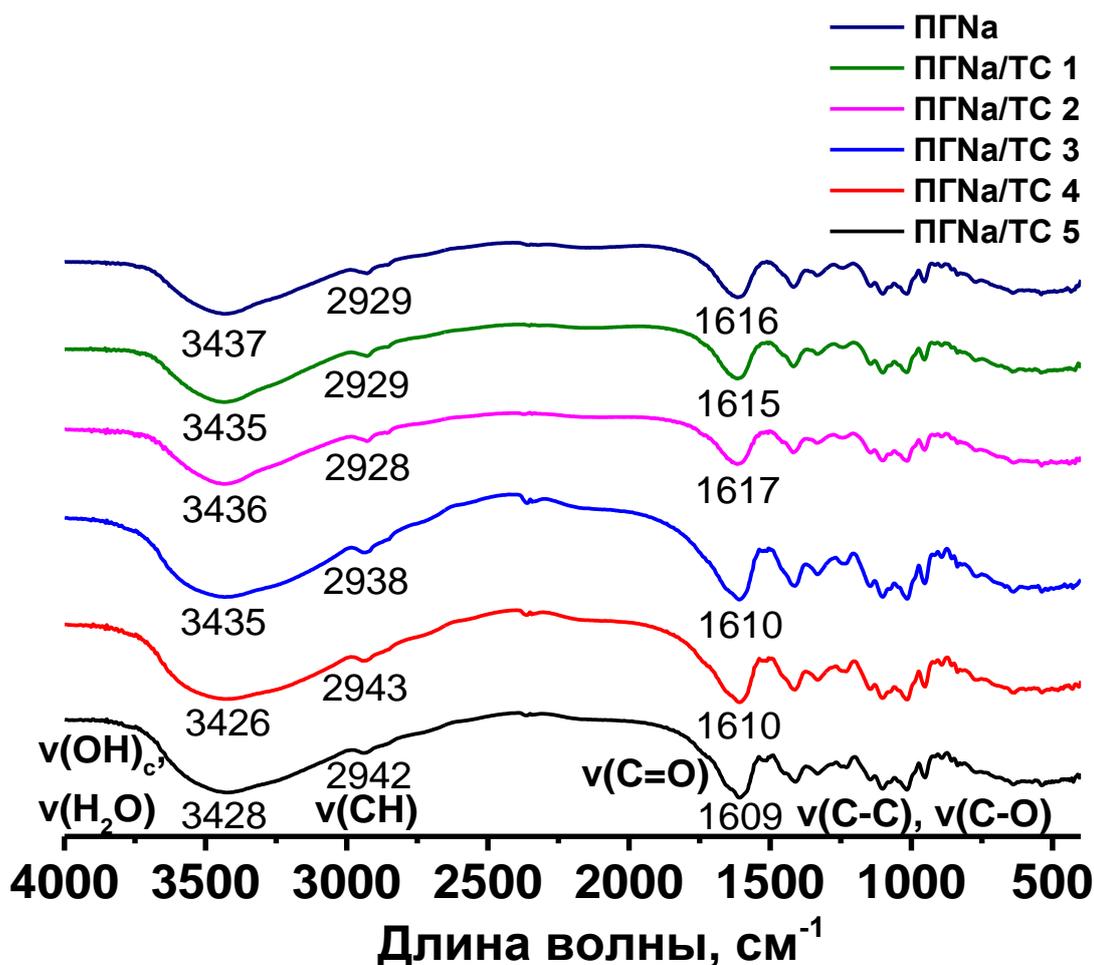


Рисунок 23 – ИК-спектры водных растворов полигалактуроната натрия, гидрохлорида тетрациклина и комплексов на их основе (ПГNa/ТС 1–5)

УФ-спектры водных растворов полигалактуроната натрия (ПГNa), гидрохлорида тетрациклина (ТС·НСl) и комплексов на их основе (ПГNa/ТС 1–5) представлены на рисунке 24.

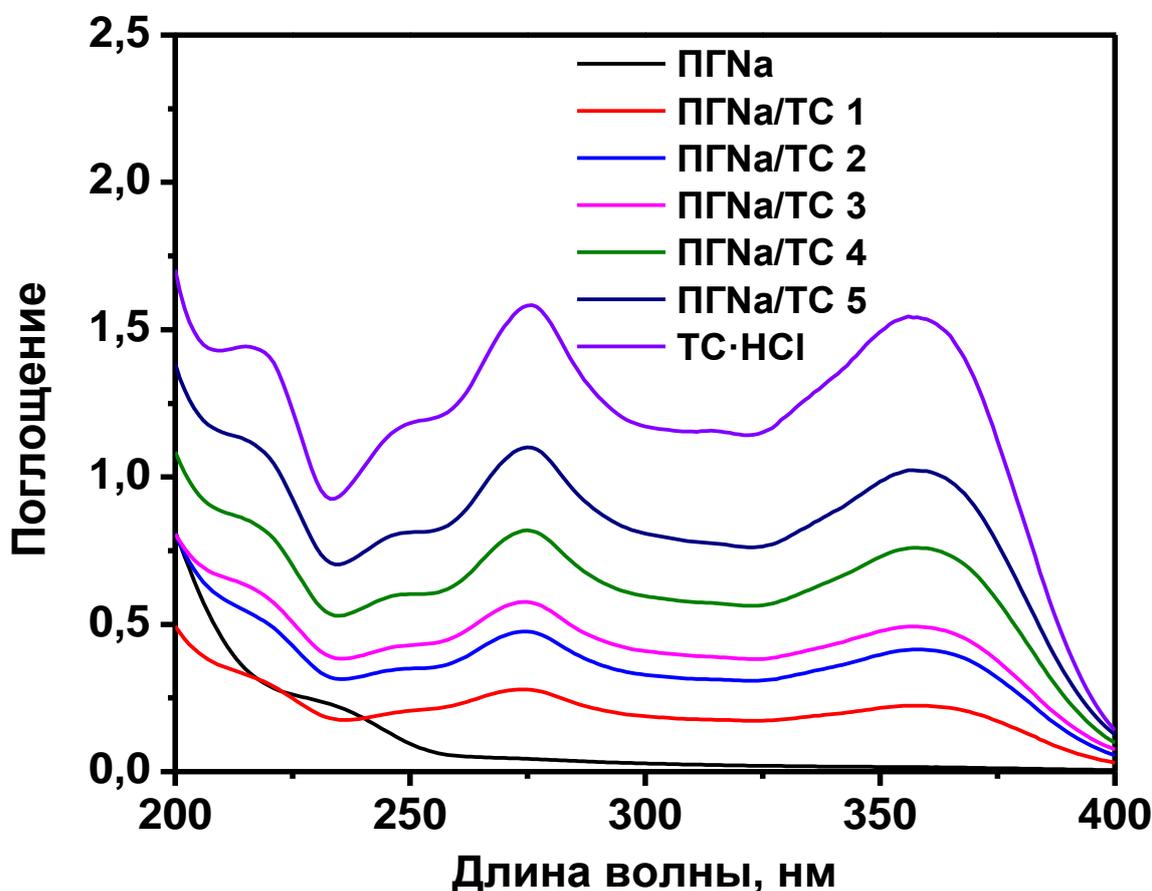
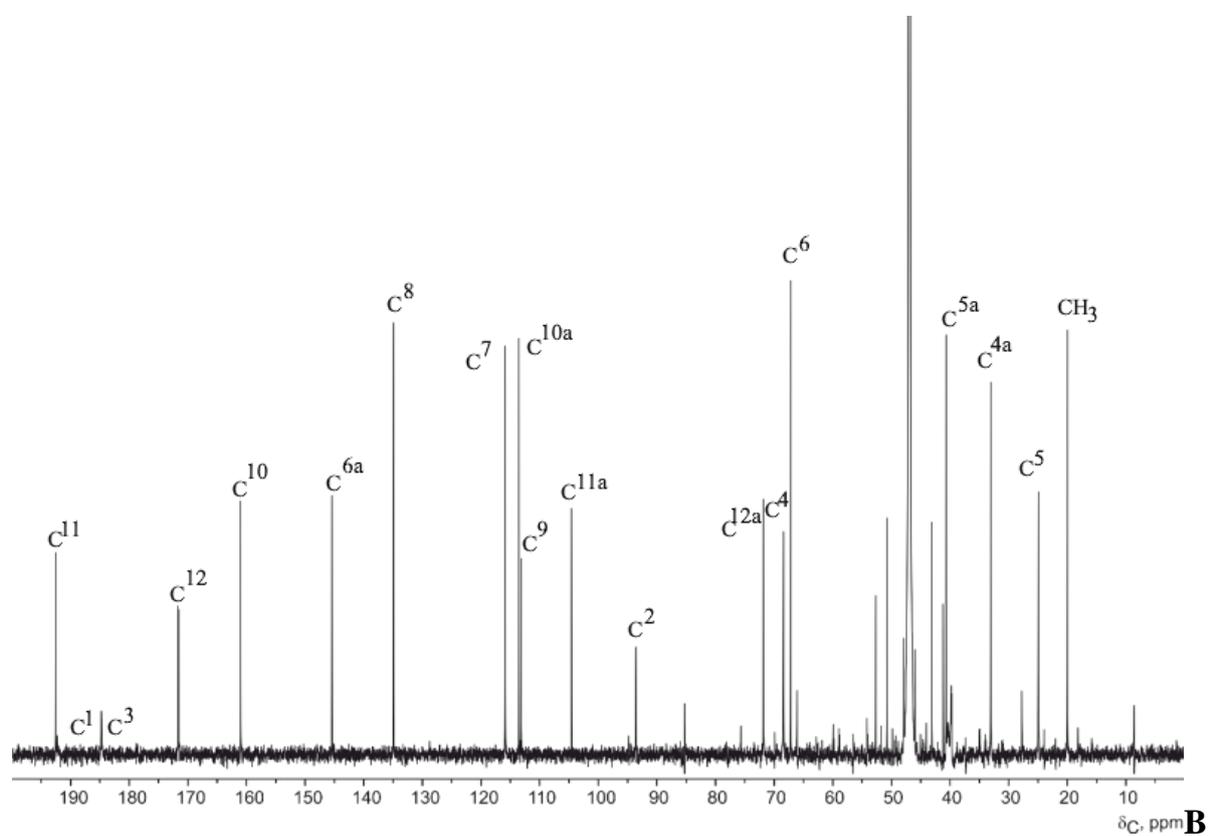
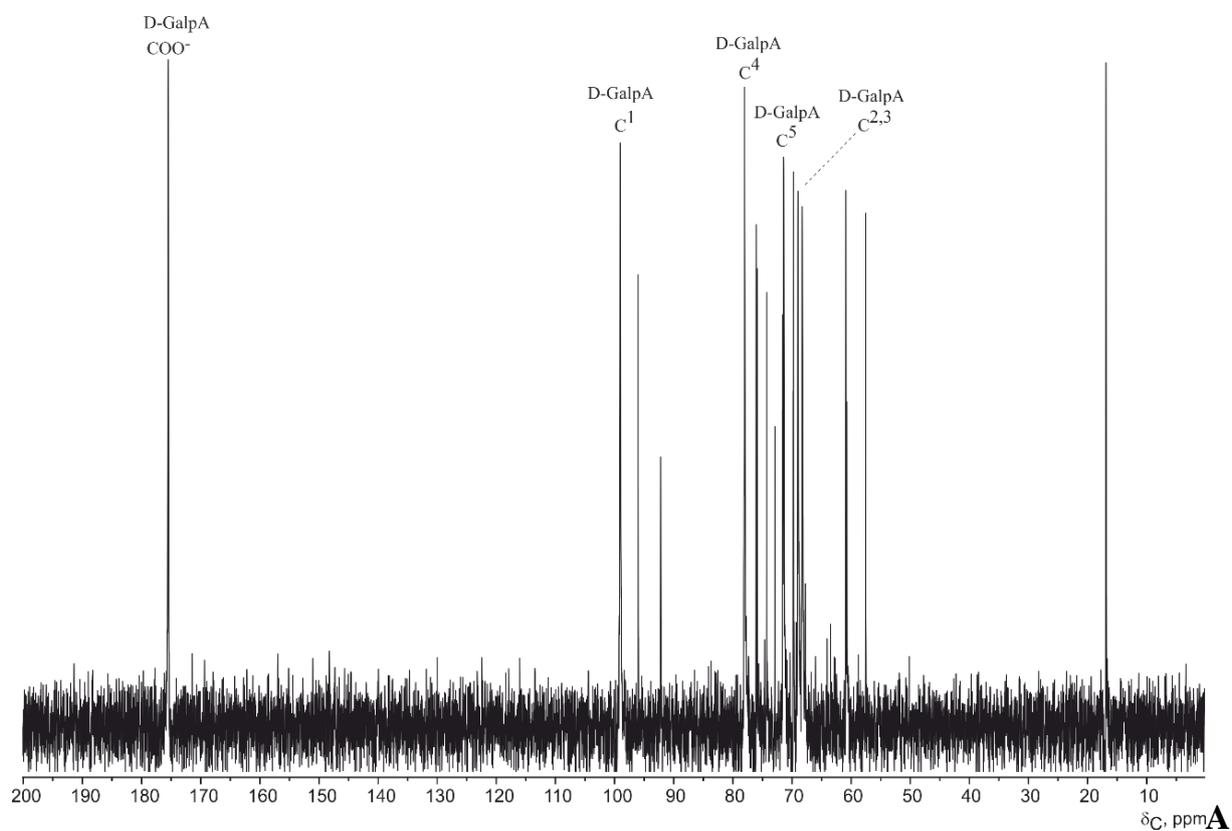


Рисунок 24 – УФ-спектры водных растворов полигалактуроната натрия, гидрохлорида тетрациклина и комплексов 1–5 на их основе (концентрация 0.05%).

УФ-спектр раствора ТС·НСl (концентрация 0.05%, рисунок 24) в области от 200 до 400 нм характеризуется полосами поглощения при 276 ± 2 нм, 357 ± 2 нм и менее четко выраженным пиком при 216 ± 2 нм. Водный раствор ПГNa (концентрация 0.05%) не имеет характеристических полос в ультрафиолетовой области спектра, за исключением поглощения при 200 нм и плеча при 225 нм.

В УФ-спектрах комплексов 1–5 (рисунок 24) проявляются все вышеперечисленные полосы поглощения. Кроме того, в спектрах комплексов наблюдается плечо (249 ± 2 нм), которое имеет максимальную интенсивность в случае образцов 4–5.

Также полигалактуронат натрия, гидрохлорид тетрациклина и ПГNa/ТС 4 были исследованы методом ЯМР-спектроскопии (150.9 МГц, D₂O, рисунок 25).



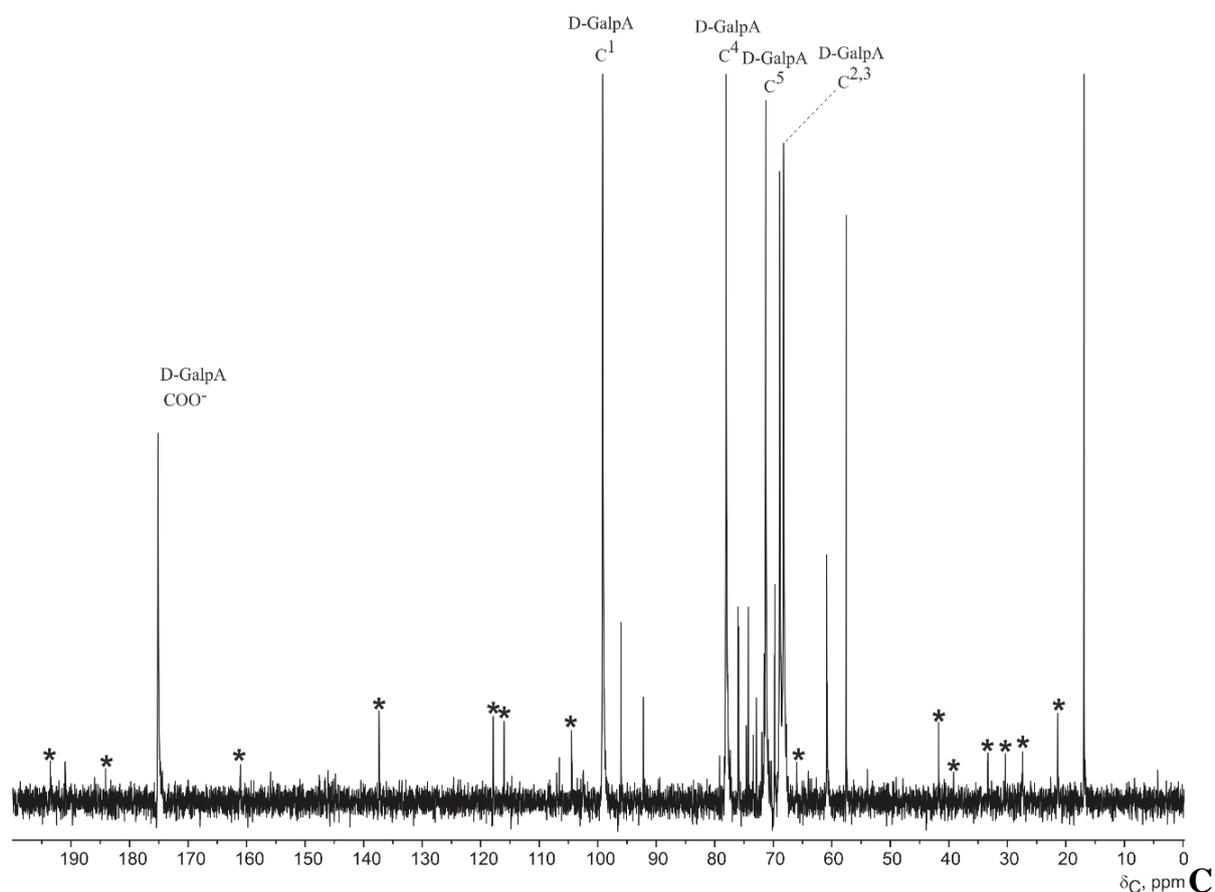
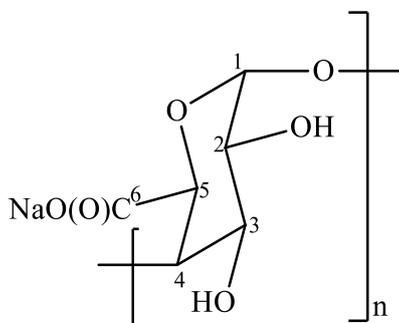


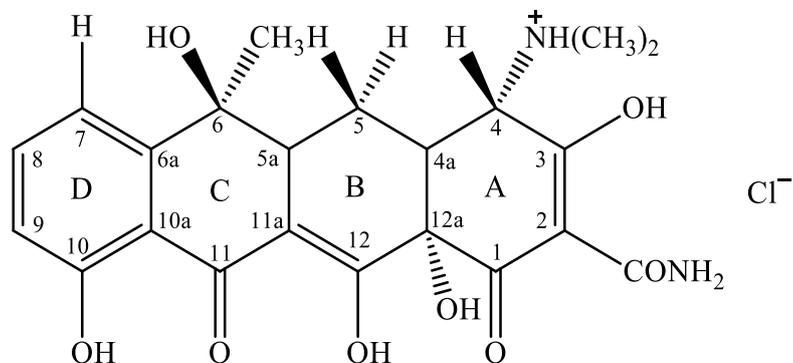
Рисунок 25 – Спектры ЯМР $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ (100.9 МГц) полигалактуроната натрия (А), гидрохлорида тетрациклина (В) и ПГNa/ТС 4 (С)

В спектре ПГNa (рисунок 25А) присутствуют следующие сигналы (δC , м.д.): 99–100 (C(1)), 68 (C(2), C(3)), 78 (C(4)), 72 (C(5)), 177 (C(6)). Их положение и вид соответствуют спектру α -1,4-D-галактопиранозилуронана. Среди других сигналов в спектре ЯМР ^{13}C полигалактуроната натрия следует отметить сигналы в сильном поле при δC 17 м.д., принадлежащие метильной группе L-рамнопиранозы.



Спектр гидрохлорида тетрациклина (рисунок 25В) характеризуется присутствием 21-го сигнала, 18 из которых отвечают резонансу сигналов атомов углерода колец А, В, С, D (δC , м.д.): 25 (C(5)), 33 (C(4a)), 42 (C(5a)), 68 (C(6)), 69 (C(4)), 72 (C(12a)), 94 (C(2)),

105 (C(11a)), 113 (C(9)), 113 (C(10a)), 116 (C(7)), 135 (C(8)), 145 (C(6a)), 161 (C(10)), 171 (C(12)), 185 (C(3)), 185 (C(1)), 193 (C(11)). Три оставшихся соответствуют сигналам метильной группы $-\text{CH}_3$ (20 м.д.), группы $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ (43 м.д.) и амидной группы $-\text{CONH}_2$ (172 м.д.).



Спектр комплекса (рисунок 25С) содержит сигналы, которые являются характерными как для спектра полигалактуроната натрия (1; δC , м.д.): 99—100 (C(1)), 68 (C(2), C(3)), 78 (C(4)), 72 (C(5)), 177 (C(6)), 17 (L-рамнопираноза)); так и для спектра гидрохлорида тетрациклина (2; δC , м.д.): 28 (C(5)), 33 (C(4a)), 41 (C(5a)), 65 (C(6)), 105 (C(11a)), 115 (C(9)), 115 (C(10a)), 118 (C(7)), 138 (C(8)), 161 (C(10)), 185 (C(3)), 185 (C(1)), 195 (C(11)), 22 (метильная группа $-\text{CH}_3$), 43 (группа $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$). При этом наблюдается смещение некоторых сигналов (δC , м.д.) относительно спектра чистого тетрациклина 20→22 (метильная группа $-\text{CH}_3$), 25→28 (C(5)), 42→41 (C(5a)), 68→65 (C(6)), 113→115 (C(9)), 113→115 (C(10a)), 116→118 (C(7)), 135→138 (C(8)), 193→195 (C(11)).

Для подтверждения комплексообразования ПГNa с ТС было проведено сравнительное исследование ПГNa, $\text{ТС}\cdot\text{HCl}$ и продуктов их взаимодействия методом порошковой рентгеновской дифракции (рисунок 26).

Для дифрактограммы гидрохлорида тетрациклина характерно наличие отчетливых интерференционных пиков, соответствующих его кристаллической фазе. На дифрактограммах ПГNa и ПГNa/ТС 2, 3, 5 наблюдаются серии достаточно уширенных пиков (рисунок 26), причем их угловое положение, форма и число практически не отличаются для этих образцов, кроме комплекса 5, для которого наблюдаются нарушения морфологии крупных пиков, их смещение и появление нескольких очень слабых пиков на его дифрактограмме.

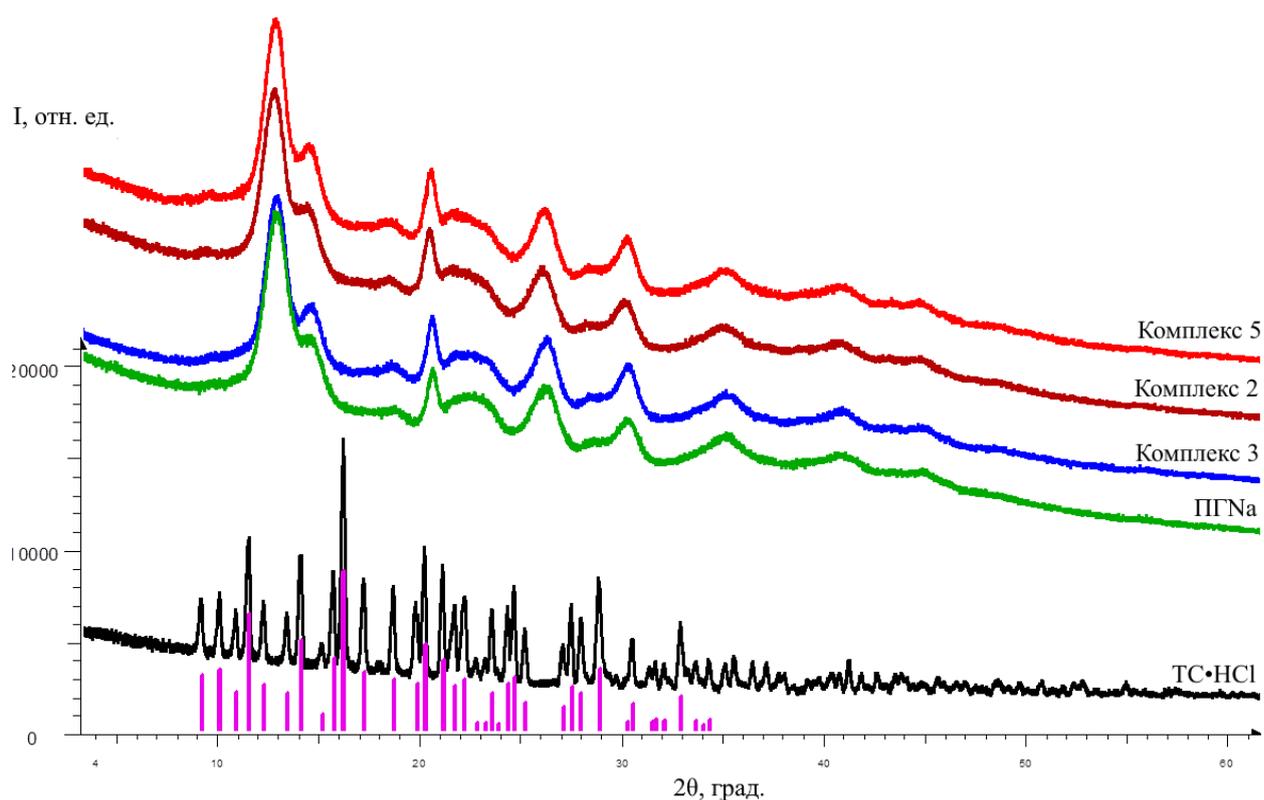


Рисунок 26 – Экспериментальные дифрактограммы для исследованных образцов, для наглядности кривые сдвинуты друг относительно друга по интенсивности

Сравнение полученных данных свидетельствует о том, что при взаимодействии ПГNa с ТС·HCl, по-видимому, не происходит выделения последнего в исходную кристаллическую фазу, а наблюдается гомогенное распределение в массе образца, что косвенно указывает на факт образования комплексов (поскольку наличие тетрациклина в образцах подтверждено другими физико-химическими методами).

Водные растворы ПГNa и его комплексов с тетрациклином были изучены методом динамического рассеяния света (ДРС, рисунок 27). Изучение самоорганизации водных систем полигалактуроната натрия и его комплексов **1–5** выявило образование частиц с мономодальным распределением по интенсивности и по объему светорассеяния. Было показано, что размер частиц в водных системах комплексов **1** и **2** не отличается от размера частиц исходного полигалактуроната натрия, а в водных системах комплексов **3** и **4** отличается незначительно, поэтому в качестве примера на рисунке 5 приведены графики для комплексов **4** и **5**, продемонстрировавшие наибольшее изменение.

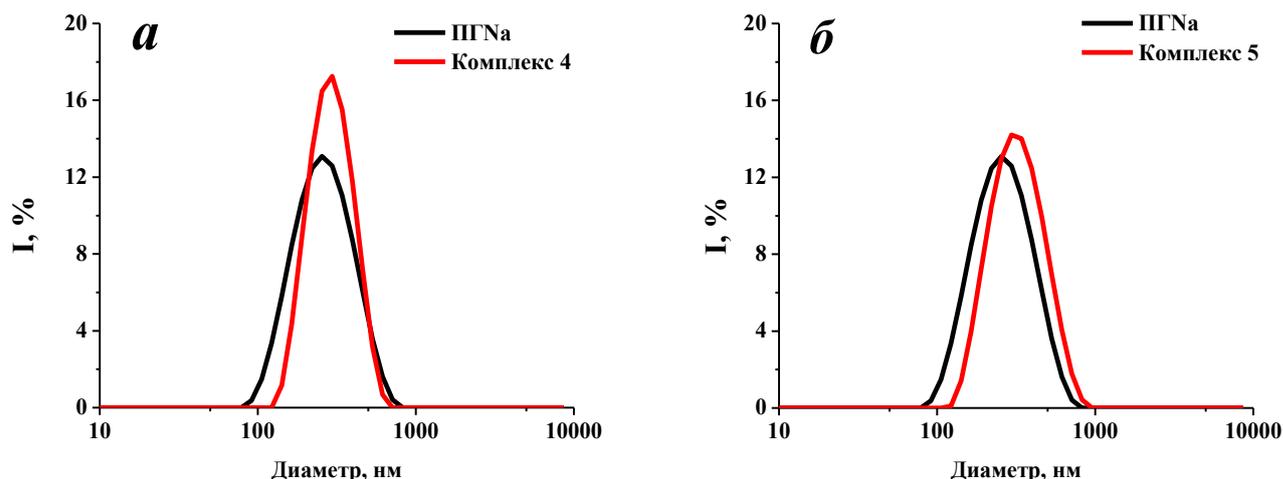


Рисунок 27 – Распределение частиц по размеру (D , нм) в растворах полигалактуроната натрия (ПГNa), ПГNa/ТС 4 (а) и ПГNa/ТС 5 (б), 25°C (концентрация 0.1%)

Средний гидродинамический диаметр частиц в максимуме кривой распределения (рисунок 27) для полигалактуроната натрия составил 279 ± 10 нм, для комплекса 3 – 302 ± 4 нм, для комплекса 4 – 305 ± 5 нм, для комплекса 5 – 341 ± 6 нм. Образование комплексов 4 и 5 подтверждается сопровождающимся смещением пиков (рисунок 16) изменением размера частиц, изменением интенсивности светорассеяния, а также уменьшением практически в два раза индекса полидисперсности (PDI). Для ПГNa PDI составляет 0.252, для комплекса 4 – 0.122, для комплекса 5 – 0.127.

Изучение ζ -потенциала частиц в системах ПГNa и его комплексов с ТС показало, что ζ -потенциал частиц комплексов ПГNa/ТС 4 и 5 практически в два раза меньше ζ -потенциала частиц полигалактуроната натрия, составляя -25 мВ, -33 мВ и -57 мВ, соответственно.

На рисунке 28 представлены микрофотографии образцов полигалактуроната натрия (А), гидрохлорида тетрациклина (Б) и комплекса 3 (В). Как можно увидеть, гидрохлорид тетрациклина демонстрирует кристаллическую структуру, что подтверждается литературными данными. Полигалактуронат натрия (А) представляет собой аморфный порошок, полученный комплекс 3 имеет схожий с полигалактуронатом натрия характер поверхности (аморфный порошок) при увеличении в 30 раз, а при увеличении в 70 раз изображения комплексов имеют более однородный характер поверхности, чем исходный полигалактуронат натрия. Поэтому можно высказать

предположение о равномерном распределении ТС в объеме полигалактуроната натрия, что косвенно свидетельствует о комплексобразовании.

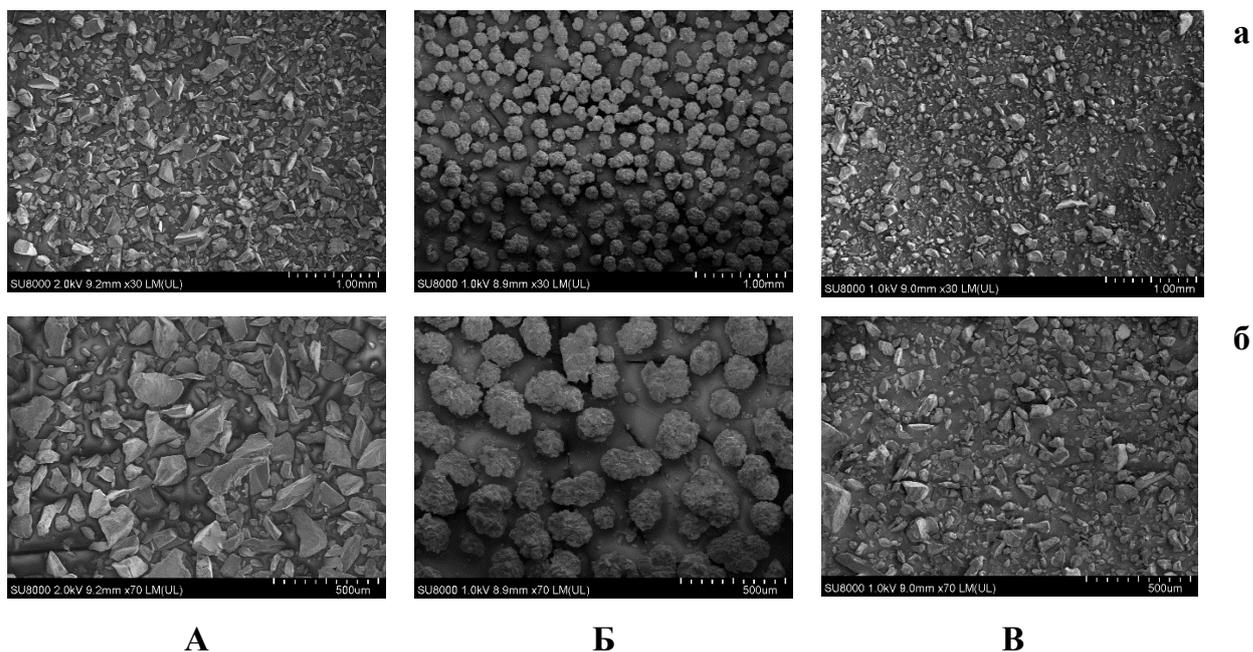


Рисунок 28 – Электронные микрофотографии образцов полигалактуроната натрия (А), гидрохлорида тетрациклина (Б) и ПГNa/ТС 3 (В), увеличение $\times 30$ (а) и $\times 70$ (б)

Пектиновые полисахариды, как органическая матрица, могут устранить побочные эффекты и усилить фармакологическое действие лекарственных средств, а также оказывать влияние на их высвобождение. Была изучена кинетика высвобождения тетрациклина из полученных пектиновых комплексов. На графике (рисунок 29) представлены кинетические кривые высвобождения тетрациклина из ПГNa/ТС 3 (А) и 5 (Б) в фосфатном буферном растворе (рН 7.4). Показано, что тетрациклин хорошо высвобождается из пектиновых комплексов, так, из комплекса 3 через три часа степень его высвобождения достигает 81.56%, а для комплекса 5 – 83.34%.

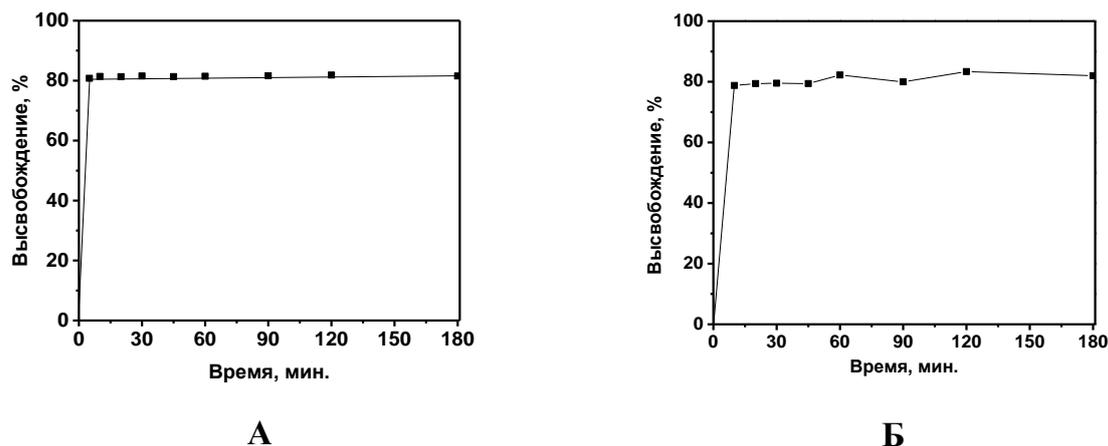


Рисунок 29 - Профили высвобождения тетрациклина из комплекса **3** (А) и комплекса **5** (Б) (Среда растворения – фосфатный буферный раствор (рН 7.4), данные получены при $\lambda = 276$ нм)

Таким образом, на основании данных ИК, УФ и ЯМР спектроскопии, методов порошковой рентгеновской дифракции, динамического рассеяния света и сканирующей электронной микроскопии показано образование устойчивых водорастворимых комплексов полигалактуроната натрия с гидрохлоридом тетрациклина. На основании экспериментальных данных кинематической вязкости растворов, поляриметрии и растворимости комплексов установлено, что **ПГNa/ТС 3** и **4** находятся в интервале оптимальных соотношений полигалактуроната натрия и гидрохлорида тетрациклина 4.4:1.0–3.6:1.0 при растворимости целевых продуктов, равной 99.33%. **ПГNa/ТС 1** и **2** также демонстрируют растворимость 99.33%, однако степень связывания тетрациклина в них минимальна. Максимальный процент связывания тетрациклина с пектином составляет 6.68% для **ПГNa/ТС 5**, вместе с тем его растворимость составляет 96.00%.

2.2.2 Комплексы полигалактуроната натрия с амоксициллином

Проведена серия экспериментов, позволившая исследовать закономерности комплексообразования цитрусового пектина с амоксициллином в зависимости от концентрации последнего, значения рН исходного раствора, а также определить характеристики полученных продуктов. В результате взаимодействия 2%-ого водного раствора полигалактуроната натрия с растворами гидрохлорида амоксициллина в водном этаноле (при варьировании соотношения ПГNa и АХ, таблица 12)

синтезированы комплексы **1–3**. Исходный водный раствор ПГNa был предварительно получен путем растворения точной навески ранее синтезированного полигалактуроната натрия в дистиллированной воде.

Таблица 12 – Характеристические данные к синтезу комплексов **1–3**

Образец	Массовое соотношение ПГNa и гидрохлорида амоксициллина	Количество связанного амоксициллина (± 0.01), %
ПГNa/AX 1	5.7:1.0	4.3
ПГNa/AX 2	4.0:1.0	6.2
ПГNa/AX 3	3.1:1.0	8.0

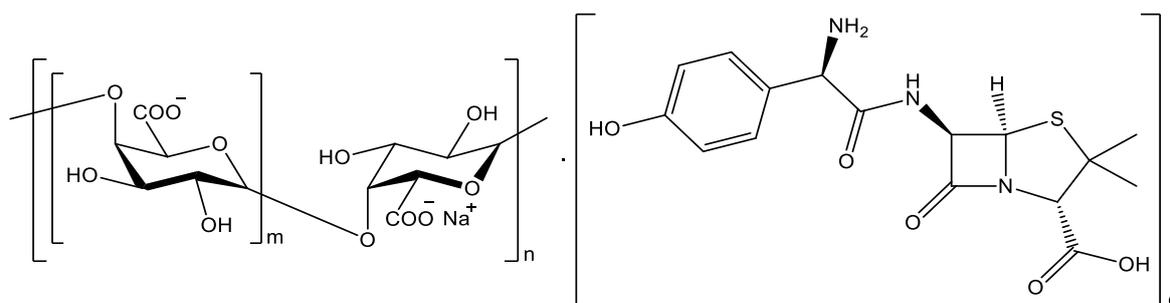


Схема 4 – Комплексы ПГNa/AX

Впоследствии из реакционной среды продукты осаждали этанолом, центрифугировали их и дополнительно промывали этиловым спиртом для очистки комплексов **1–3** от физически сорбированного тетрациклина, высушивали и измельчали. Далее охарактеризовали 0.5%-е водные растворы полученных комплексов и ПГNa (таблица 13).

Показано, что комплексообразование ПГNa с амоксициллином позволяет получить водорастворимые продукты **1–3** (таблица 13).

Таблица 13 – Экспериментальные данные

Образец	pH (± 0.005)	$[\alpha]_D^{20}$ (<i>c</i> 0.5; H ₂ O)	Кинематическая вязкость, мм ² /с (± 0.001)
ПГNa	7.789	+205	1.451
ПГNa/АХ 1	6.124	+207	1.427
ПГNa/АХ 2	5.899	+206	1.411
ПГNa/АХ 3	5.662	+201	1.395

Показано, что с увеличением концентрации амоксициллина в комплексах ПГNa/АХ (таблица 12, 13) наблюдается уменьшение значения pH 0.5%-х растворов, и в образце **3** pH достигает минимального значения 5.662 в изученном диапазоне. Водные растворы ПГNa и ПГNa/АХ **1–3** исследованы также с помощью методов вискозиметрии и поляриметрии (таблица 13). Так, методом поляриметрии показано, что при увеличении доли амоксициллина в составе комплексов величина удельного оптического вращения и кинематическая вязкость растворов полученных комплексов уменьшаются (таблица 13).

Образование ПГNa/АХ **1–3** подтверждено физико-химическими методами (ИК и УФ спектроскопия).

Методом ИК-спектроскопии (рисунок 30) показано, что при комплексообразовании с полигалактуронатом натрия в спектре продуктов присутствуют полосы поглощения валентных колебаний групп С=О в областях 3425–3444 см⁻¹, что можно объяснить увеличением числа гидроксильных групп при связывании с амоксициллином. Кроме того, в спектрах также наблюдается последовательное смещение полосы поглощения ОН-групп с максимумами при 1609–1616 см⁻¹. Вероятно, это связано с образованием водородных связей между карбоксильными группами биополимера и молекулами амоксициллина. Кроме того, в спектрах комплексов ПГNa/АХ **1–3** появилась полоса поглощения валентных колебаний N–H групп, например, для комплекса ПГNa/АХ **3** в области 1519 см⁻¹. Деформационные колебания групп в области 1200–1500 см⁻¹, характерные для связи С–Н, демонстрируют небольшое смещение, которое, возможно, обусловлено образованием ионных связей между карбоксильными группами ПГNa и амоксициллина, в то время как полосы поглощения валентных колебаний С–С и С–О пиранозных колец в области 1150–1000 см⁻¹ не

претерпевают значительных изменений, равно как и низкочастотные колебания пиранозного цикла.

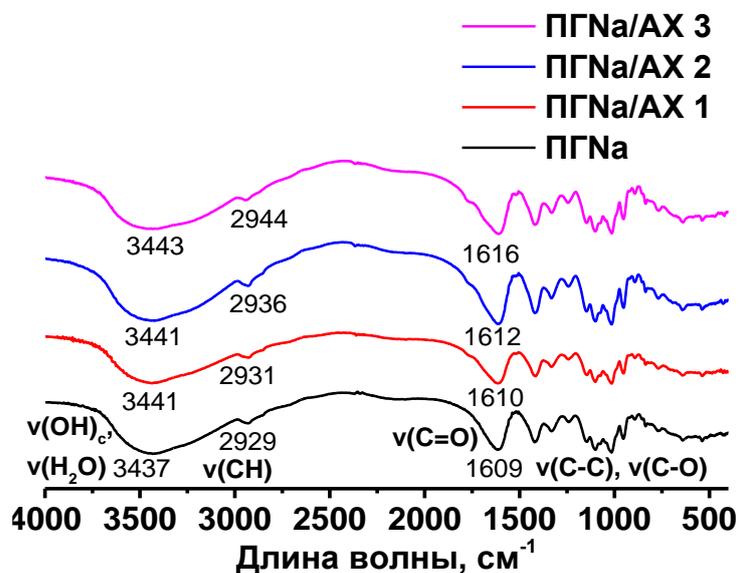


Рисунок 30 – ИК-спектры полигалактуроната натрия и его комплексов с амоксициллином (ПГNa/AX 1–3)

УФ-спектры водных растворов полигалактуроната натрия (ПГNa) и его комплексов с амоксициллином (ПГNa/AX 1–3) представлены на рисунке 31.

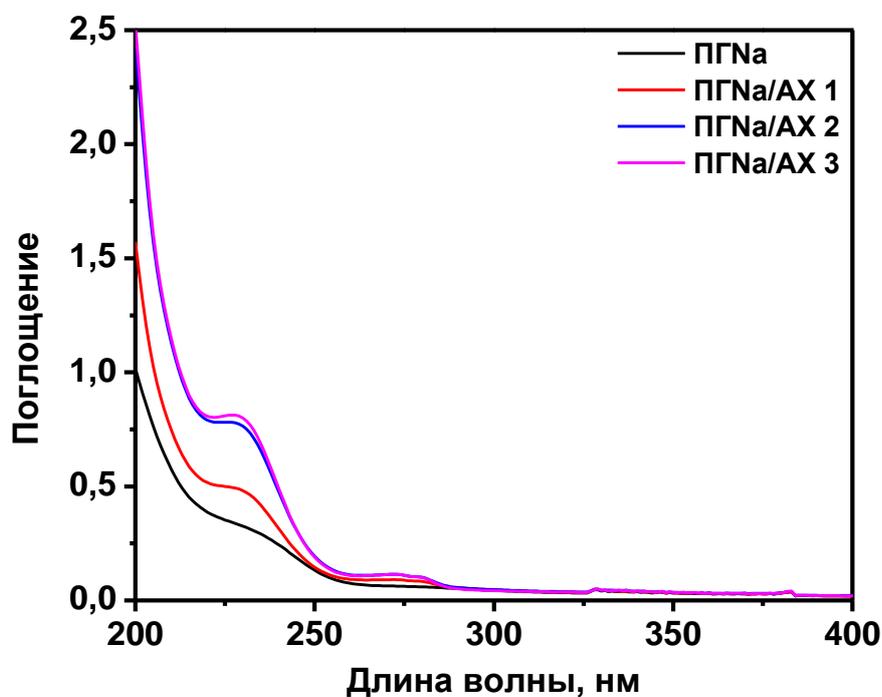
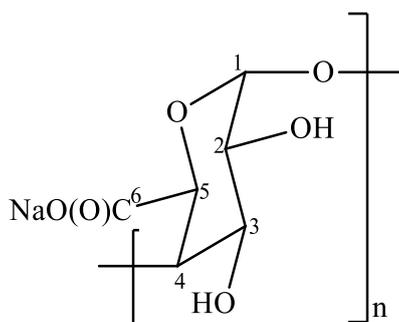


Рисунок 31 – УФ-спектры водных растворов полигалактуроната натрия и комплексов 1–3 на его основе (концентрация 0.05%)

Водный раствор ПГNa (концентрация 0.05%) не имеет характеристических полос в ультрафиолетовой области спектра, за исключением поглощения при 200 нм и небольшого плеча при 225 нм, которые проявляются и в УФ-спектрах комплексов **1–3**. Кроме того, в спектрах комплексов наблюдаются плечи (230 ± 2 нм и 270 ± 2 нм), которые имеют максимальную интенсивность в случае образца **3**.

Также полигалактуронат натрия и комплекс **3** были исследованы методом ЯМР-спектроскопии (150.9 МГц, D₂O, рисунок 32).

В спектре ПГNa (рисунок **32А**) присутствуют следующие сигналы (δ C, м.д.): 100 (C(1)), 68–70 (C(2), C(3)), 78 (C(4)), 72 (C(5)), 178 (C(6)). Их положение и вид соответствуют спектру α -1,4-D-галактопиранозилуронана. Среди других сигналов в спектре ЯМР ¹³C полигалактуроната натрия следует отметить сигнал в сильном поле при δ C 17 м.д., принадлежащие метильной группе L-рамнопиранозы.



В спектре комплекса ПГNa/АХ **3** (рисунок **32В**) присутствуют сигналы, которые являются характерными как для спектра полигалактуроната натрия (1; δ C, м.д.): 100 (C(1)), 68–70 (C(2), C(3)), 78 (C(4)), 72 (C(5)), 178 (C(6)); так и для спектра амоксициллина (2; δ C, м.д.): 65 (C(2)), 178 (C(15), C(23)), 73 (C(22)).

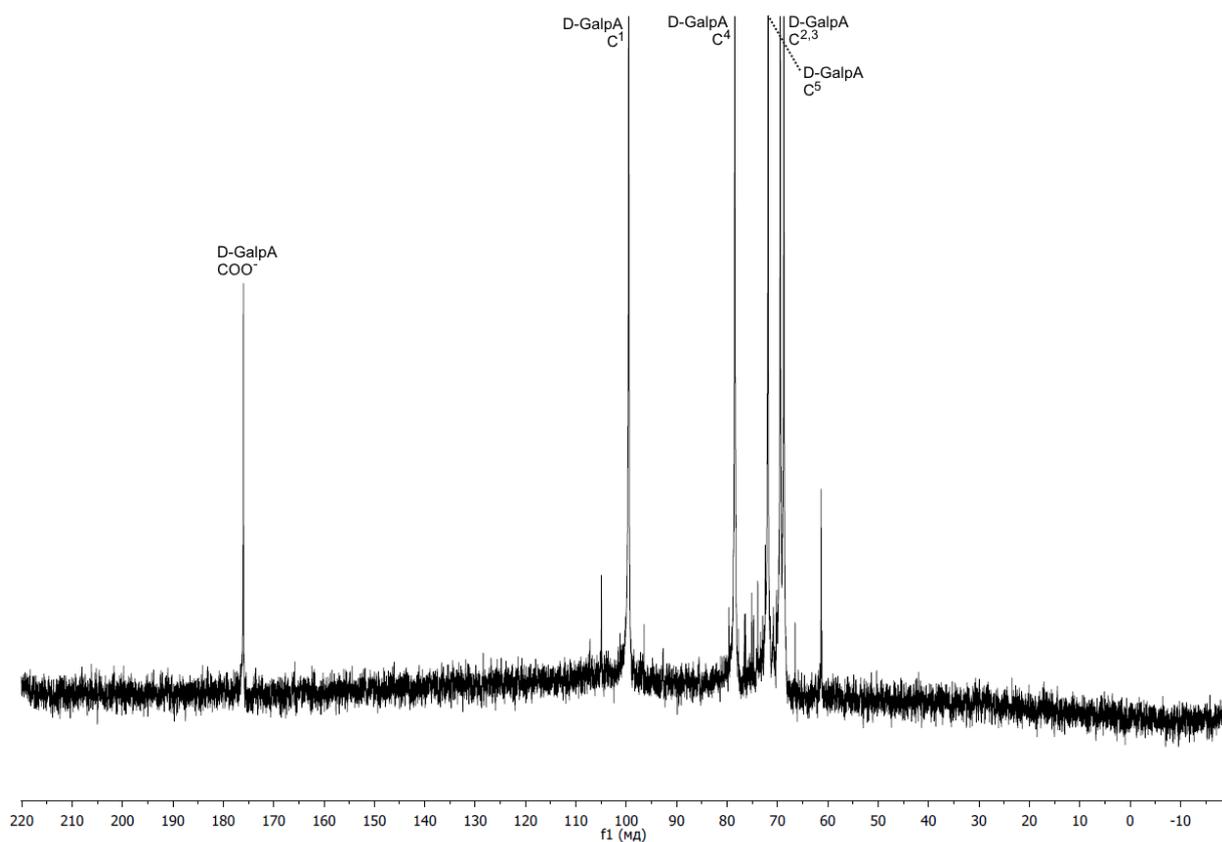
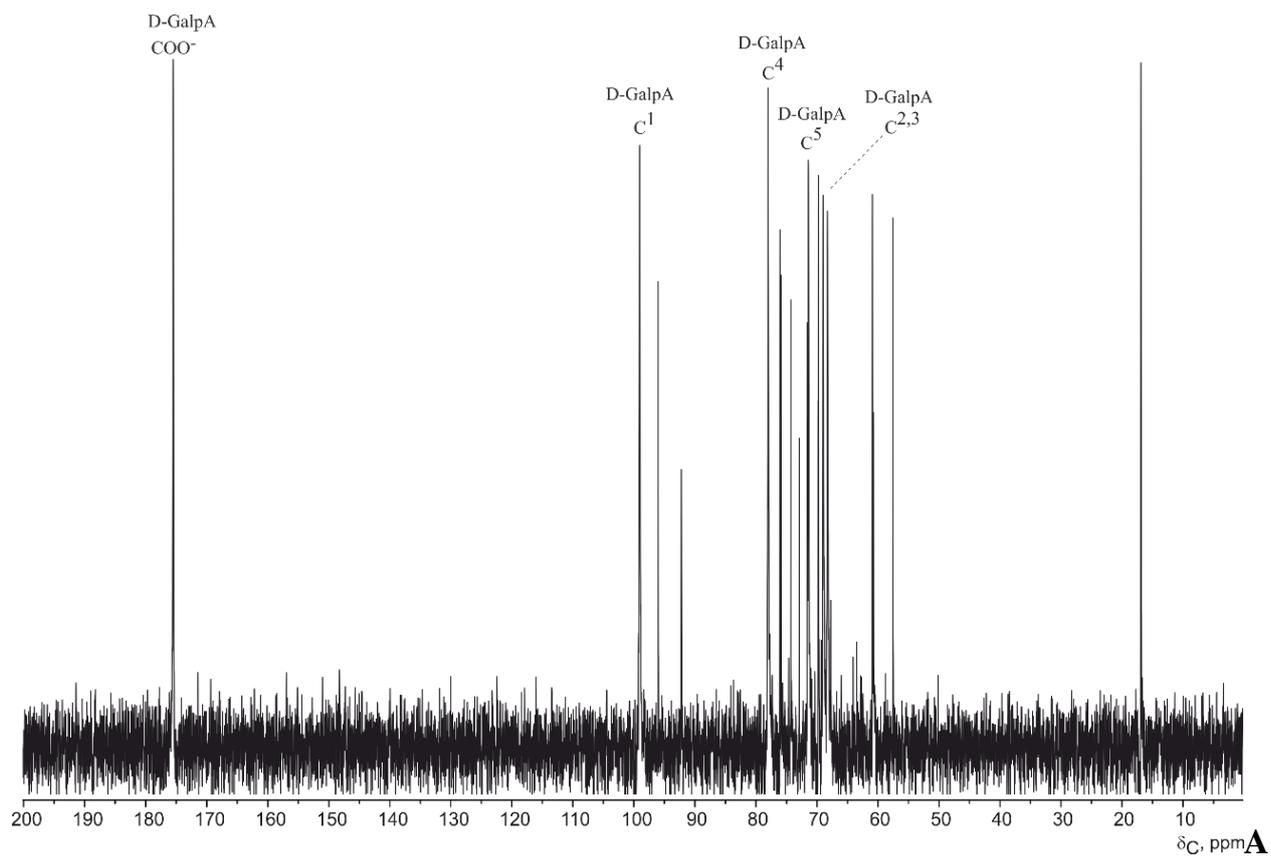
**B**

Рисунок 32 – Спектры ЯМР ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ (100.9 МГц) полигалактуроната натрия (А) и ПГNa/АХ 3 (В)

Таким образом, на основании данных ИК- и УФ- спектроскопии показано образование устойчивых водорастворимых комплексов полигалактуроната натрия с гидрохлоридом амоксициллина. На основании экспериментальных данных кинематической вязкости и оптической активности растворов комплексов установлено, что **ПГNa/АХ 3** находится в интервале оптимальных соотношений полигалактуроната натрия и гидрохлорида амоксициллина 3.4:1.0. Максимальный процент связывания амоксициллина с пектином на основе данных элементного анализа составляет 8.0%.

2.2.3 Исследование термостабильности новых комплексов полигалактуроната натрия с антибиотиками

Исследование термостабильности новых комплексов полигалактуроната натрия с гидрохлоридом тетрациклина. Термостабильность лекарственных средств – одна из важнейших характеристик, определяющая условия их хранения, что обуславливает актуальность исследований. Методом синхронного термического анализа, которым регистрируется изменение массы образца в зависимости от температуры с соответствующими тепловыми эффектами в сравнении с полигалактуронатом натрия (рисунок 33), была исследована термостабильность новых комплексов ПГNa/ТС.

Анализ полученных результатов показывает, что кривые ТГ/ДСК ПГNa и комплексов **4** и **5**, полученных взаимодействием при различных соотношениях, имеют схожий характер: исходный ПГNa и комплексы с различным содержанием тетрациклина имеют по две стадии потери массы с идентичными характеристичными температурными пиками на кривой ДТГ и соответствующими им пиками на кривой ДСК. В то же время гидрохлорид тетрациклина продемонстрировал лишь одну стадию потери массы. ИК-Фурье спектр газообразных продуктов термического разложения соединений показал, что вода была основным компонентом газовой фазы на первой стадии потери массы, на второй происходило декарбоксилирование полигалактуронатной цепи (таблица 14).

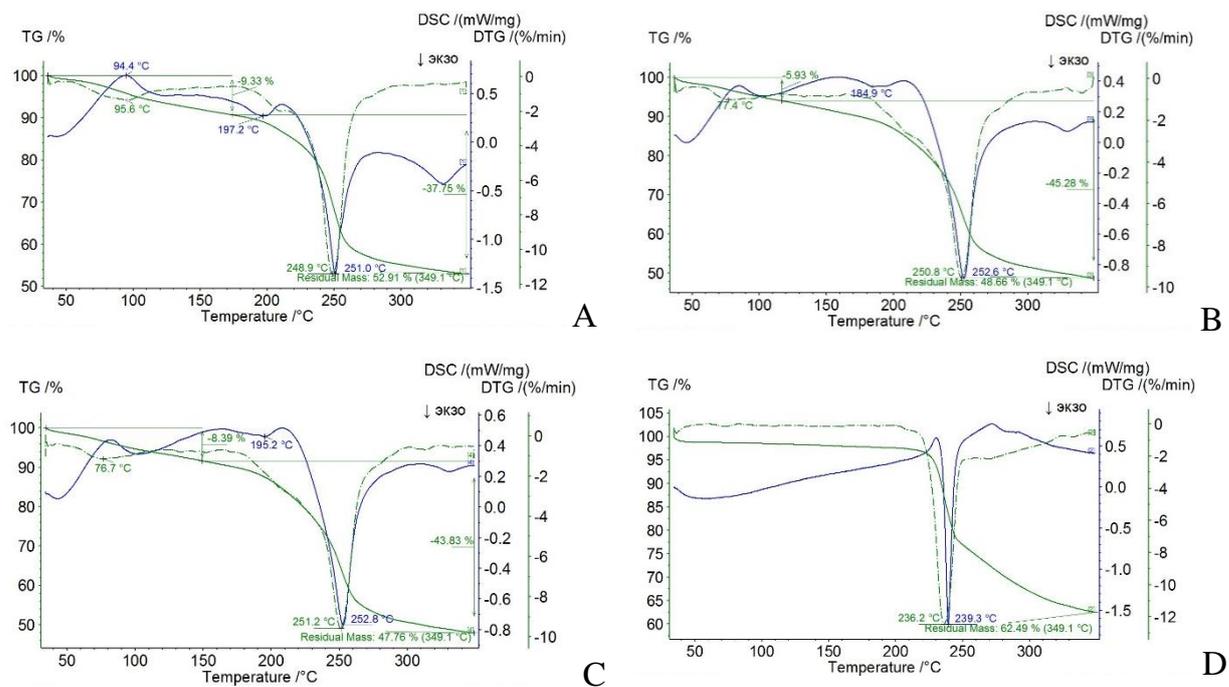


Рисунок 33 – Данные ТГ/ДСК для полигалактуроната натрия (А), комплекса **4** (В), комплекса **5** (С), а также гидрохлорида тетрациклина (D)

Таблица 14 – Данные ТГ/ДСК для полигалактуроната натрия, гидрохлорида тетрациклина и комплексов **4** и **5** на стадиях потери массы 1–2

Образец	Стадии потери массы					
	1			2		
	ДТГ	ДСК	ΔТГ (%)	ДТГ	ДСК	ΔТГ (%)
	°C			°C		
ПГNa	95.6	94.4	9.3	248.9	251.0	37.8
ПГNa/ТС 4	77.4	–	5.9	250.8	252.6	45.3
ПГNa/ТС 5	76.7	–	8.4	251.2	252.8	43.8
ТС·HCl	–	–	–	236.2	239.3	37.5

Исследование термостабильности новых комплексов полигалактуроната натрия с амоксициллином. В рамках изучения физико-химических свойств новых комплексов ПГNa/АХ была также исследована их термостабильность (рисунок 34).

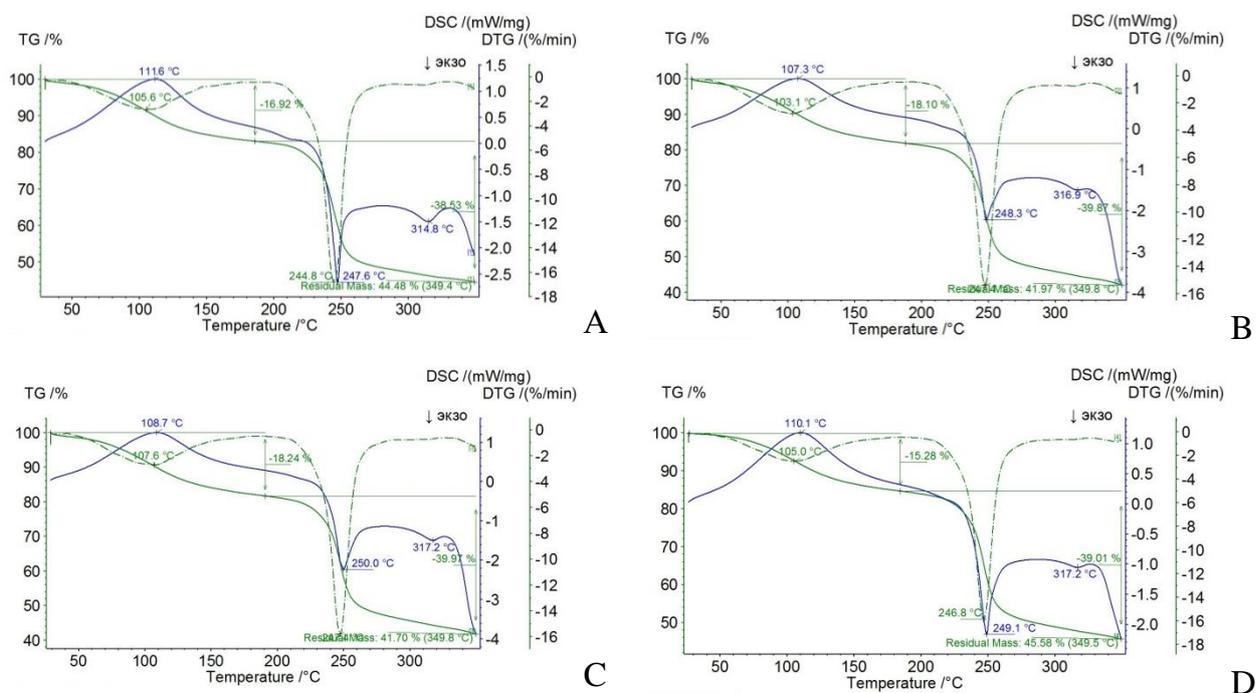


Рисунок 34 – Данные ТГ/ДСК для полигалактуроната натрия (А), ПГNa/АХ 1 (В), ПГNa/АХ 2 (С), ПГNa/АХ 3 (D)

Анализ полученных результатов показывает, что кривые ТГ/ДСК ПГNa и комплексов **1**, **2** и **3**, полученных взаимодействием при различных соотношениях, имеют по две стадии потери массы с идентичными характеристичными температурными пиками на кривой ДТГ и соответствующими им пиками на кривой ДСК. ИК-Фурье спектр газообразных продуктов термического разложения соединений показал, что вода была основным компонентом газовой фазы на первой стадии потери массы, на второй происходило декарбоксилирование полигалактуронатной цепи (таблица 15).

Таблица 15 – Данные ТГ/ДСК для полигалактуроната натрия и комплексов **1, 2** и **3** на стадиях потери массы 1–2

Образец	Стадии потери массы					
	1			2		
	ДТГ	ДСК	ΔТГ (%)	ДТГ	ДСК	ΔТГ (%)
	°С			°С		
ПГNa	105.6	111.6	16.92	244.8	247.6	38.53
ПГNa/АХ 1	103.1	107.3	18.10	247.4	248.3	39.87
ПГNa/АХ 2	107.6	108.7	18.24	247.1	250.0	39.97
ПГNa/АХ 3	105.0	110.1	15.28	246.8	249.1	39.01

2.2.4 Биологическая активность комплексов пектина с противомикробными препаратами

Результаты исследования антимикробной активности комплексов цитрусового пектина с гидрохлоридом тетрациклина. Согласно поставленной цели была исследована антимикробная активность полигалактуроната натрия, гидрохлорида тетрациклина и комплексов **3, 4, 5** на их основе по отношению к тест-штаммам: *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* (таблица 16).

Анализ экспериментальных данных показывает, что комплексообразование полигалактуроната натрия с гидрохлоридом тетрациклина не приводит к снижению антимикробного действия лекарственного средства в составе комплекса. МИК и МБК комплексов **4** и **5** сопоставимы с активностью чистого препарата тетрациклин в отношении всех тест-микроорганизмов. Установлено, что МБК комплексов по отношению к *B. cereus* сопоставимы с чистым тетрациклином, а по отношению к *S. aureus* в 2 раза выше по сравнению с чистым тетрациклином соответственно.

Таблица 16 – Данные антимикробной активности ПГNa, гидрохлорида тетрациклина и комплексов **3, 4, 5** на их основе

Образцы	МИК – минимальные ингибирующие концентрации (для всех образцов, кроме ПГNa, результаты приведены в мкг/мл по Тетрациклину)		
	<i>Sa</i>	<i>Bc</i>	<i>Ec</i>
ПГNa	>10мг/мл	>10мг/мл	>10мг/мл
ПГNa/ТС 3	1.9 ± 0.1	0.9 ± 0.07	3.9 ± 0.3
ПГNa/ТС 4	1.9 ± 0.1	0.9 ± 0.06	3.9 ± 0.4
ПГNa/ТС 5	1.9 ± 0.1	0.9 ± 0.07	3.9 ± 0.3
Тетрациклин	0.9 ± 0.07	0.5 ± 0.04	0.9 ± 0.08
МБК – минимальные бактерицидные концентрации (мкг/мл по Тетрациклину)			
ПГNa	>10мг/мл	>10мг/мл	>10мг/мл
ПГNa/ТС 3	>125	62.5 ± 5.3	>125
ПГNa/ТС 4	62.5 ± 5.7	15.6 ± 1.2	31.3 ± 2.4
ПГNa/ТС 5	62.5 ± 5.5	15.6 ± 1.3	31.3 ± 2.6
Тетрациклин	31.3 ± 2.6	15.6 ± 1.3	31.3 ± 2.4

Испытания повторялись дважды; *Sa*, *Staphylococcus aureus*; *Bc*, *Bacillus cereus*; *Ec*, *Escherichia coli*.

Исследование фармакокинетики комплекса пектина с тетрациклином при однократном пероральном введении на лабораторных животных. Результаты сравнительного изучения концентрации тетрациклина в плазме крови белых крыс на фоне однократного внутрижелудочного введения ТС и ПГNa/ТС 5 в дозе 1000 мг/кг в различные временные периоды (1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 24 ч) представлены на рисунке 35.

Усреднённые фармакокинетические параметры изучаемых препаратов белых крыс на фоне однократного внутрижелудочного введения ТС и ПГNa/ТС 5 в дозе 1000 мг/кг массы тела представлены в таблице 17.

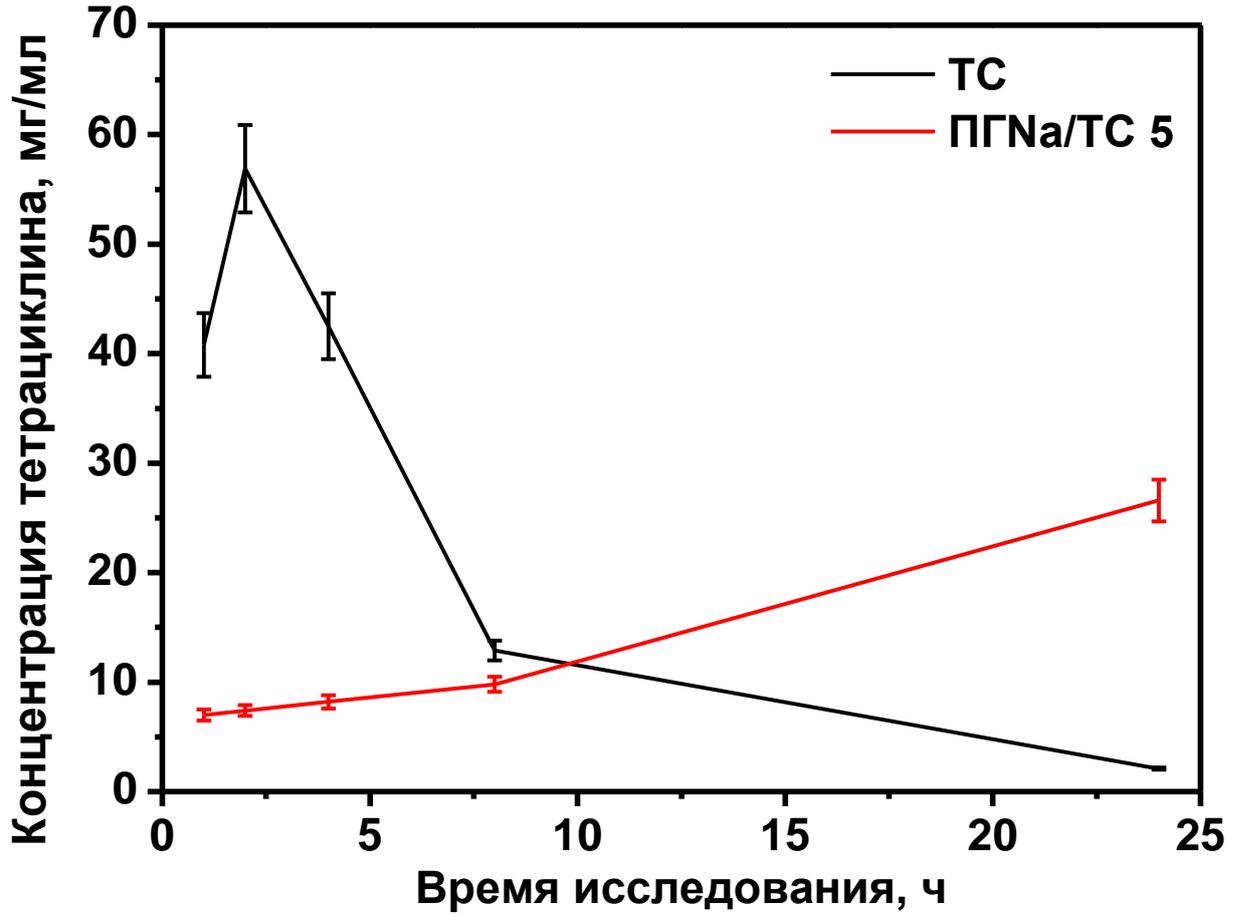


Рисунок 35 – Усреднённые фармакокинетические кривые тетрациклина в плазме крови белых крыс на фоне однократного внутрижелудочного введения ТС и ПГNa/ТС 5 в дозе 1000 мг/кг массы тела

Таблица 17 – Усреднённые фармакокинетические параметры изучаемых препаратов

Параметр	Группа животных	
	1 (ТС)	2 (ПГNa/ТС 5)
C_{\max} , МКГ/МЛ	56.9	26.6
T_{\max} , Ч	2.0	24.0
$T_{1/2}$, Ч	6.1	не уст.
$AUC_{(0-24)}$, МКГ·Ч/МЛ	9.1	7.8
f , %	100	85.0

C_{\max} – максимальная концентрация; T_{\max} – время достижения максимальной концентрации; $T_{1/2}$ – период полувыведения; $AUC_{(0-24)}$ – общее количество лекарственного препарата, высвобожденного за 24 ч; f – относительная биодоступность.

Как следует из данных, представленных в таблице 17 и на рисунке 35, кинетические кривые и параметры, как и в случае с ибупрофеном (рисунок 22), достаточно сильно отличаются от таковых при исследовании различных типов таблетированных препаратов тетрациклина. Это связано с тем, что в настоящем исследовании в качестве тест-систем были взяты лабораторные животные (крысы) и то, что дозировка была многократно превышена, т.к. основной задачей было сравнительное изучение фармакокинетики ТС и ПГNa/ТС 5 и определение основных различий и тенденций для последующих, более детальных исследований.

Максимальная концентрация ТС, достигнутая за 24 ч исследования, составила 56.9 мкг/мл, а ПГNa/ТС 5 – 26.6 мкг/мл, что на 53% ниже, чем для ПГNa/ТС 5. Время достижения максимальной концентрации за 24 ч было в 12 раз дольше, что в целом объяснимо, т.к. препараты отличаются лекарственной формой, вероятно, высвобождение тетрациклина из матрицы препарата происходит значительно медленнее. Период полувыведения у ТС составил 6.1 ч, но период полувыведения ПГNa/ТС 5 установить не удалось, т.к. длительность исследования в 24 часа является недостаточной для определения периода полувыведения ПГNa/ТС 5. Так, концентрация тетрациклина при приеме препарата ПГNa/ТС 5 была достигнута лишь к 24 ч исследования. В то же время, эти данные свидетельствуют о перспективе использования ПГNa/ТС 5 как пролонгированного препарата.

Относительная биодоступность тетрациклина из ПГNa/ТС 5 относительно ТС, взятой за 100%, составила 85.0%, это достаточно высокий показатель, а с учетом того, что концентрация тетрациклина при введении ПГNa/ТС 5 нарастает постепенно и удерживается более длительное время, вероятно, при более длительном исследовании (>24 ч), биодоступность тетрациклина из пролонгированного препарата будет выше.

Результаты исследования антимикробной активности комплексов цитрусового пектина с амоксициллином. Согласно поставленной цели, была исследована антимикробная активность амоксициллина и комплексов ПГNa/АХ 1-2 на основе цитрусового пектина по отношению к тест-штаммам: *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* (таблица 18).

Таблица 18 – Данные антимикробной активности комплексов ПГNa/АХ 1-2 на основе полигалактуроната натрия

Образцы	МИК – минимальные ингибирующие концентрации (для всех образцов, кроме ПГNa, результаты приведены в мкг/мл по Амоксициллину)		
	<i>Sa</i>	<i>Bc</i>	<i>Ec</i>
Полигалактуронат натрия	>5000	>5000	>5000
Комплекс ПГNa/АХ 1	0.25	>125	7.8
Комплекс ПГNa/АХ 2	0.125	>125	3.9
Амоксикар (препарат сравнения, ω _{АХ} = 80%)	0.125	>125	3.9
Минимальная бактерицидная активность (МБК, мкг/мл по Амоксициллину)			
Полигалактуронат натрия	>5000	>5000	>5000
Комплекс ПГNa/АХ 1	0.25	>125	>125
Комплекс ПГNa/АХ 2	0.5	>125	>125
Амоксикар (препарат сравнения, ω _{АХ} = 80%)	0.5	>125	>125

Испытания повторялись дважды; *Sa*, *Staphylococcus aureus*; *Bc*, *Bacillus cereus*; *Ec*, *Escherichia coli*

Анализ экспериментальных данных показывает, что полигалактуронат натрия не проявил антибактериальную активность в отношении всех тест-микроорганизмов. Комплексообразование полигалактуроната натрия с амоксициллином не приводило к значительному снижению антимикробного действия последнего: МИК и МБК комплекса ПГNa/АХ 2 сопоставимы с активностью препарата сравнения Амоксикара, содержащего 80% амоксициллина, в отношении всех тест-микроорганизмов. МИК комплекса ПГNa/АХ 1 по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* в сравнении с препаратом «Амоксикар» оказалась в два раза выше, что обусловлено более низким содержанием амоксициллина в комплексе.

ГЛАВА 3. Показатели норм качества полученных соединений

3.1. Методы подтверждения подлинности полученных соединений

Проведенные исследования комплексов пектина с ибупрофеном **П/ИБП 6** и пектата натрия с тетрациклином **ПГNa/ТС 5** показали низкую острую токсичность и наличие биологической активности (противовоспалительной для **П/ИБП 6** *in vivo*, противомикробной в отношении *B. cereus* для **ПГNa/ТС 5**). Таким образом, данные соединения можно рекомендовать для проведения дальнейших фармакологических исследований. Для более детальных и глубоких тестов требуется разработка методов стандартизации субстанции фармакопейного качества. Так как данные комплексы были синтезированы впервые, для них отсутствуют стандартные образцы, которые можно было бы использовать для интерпретации результатов. Ввиду данного обстоятельства были разработаны стандартные образцы комплексов пектина с ибупрофеном **П/ИБП 6** и пектата натрия с тетрациклином **ПГNa/ТС 5**, для которых разработаны проекты нормативных документов (приложения 1-2), выдержки из которых приведены ниже.

Подлинность субстанций можно устанавливать с применением спектрометрии в инфракрасной области, спектрофотометрии в ультрафиолетовой области и поляриметрии.

Идентификация комплексов пектина с ибупрофеном **П/ИБП 6** и пектата натрия с тетрациклином **ПГNa/ТС 5** может быть проведена путем сопоставления ИК-спектра вещества со стандартным спектром или со спектром стандартного образца. Сопоставление ИК-спектров проводится путем сопоставления и анализа характерных полос. В ИК-спектрах **П/ИБП 6** наблюдаются полосы поглощения гидроксильных групп в области 3446 и 3419 см^{-1} , С-Н групп в области 2955 и 2874 см^{-1} , этерифицированных карбоксильных групп в области 1722 см^{-1} и свободных карбоксильных групп при 1632 см^{-1} . Совпадение полос поглощения в рабочем и стандартном ИК-спектрах свидетельствует об идентичности веществ (рисунок 36).

В спектре стандартного образца пектата натрия с тетрациклином **ПГNa/ТС 5** наблюдаются полосы поглощения гидроксильных групп в области 3428 см^{-1} , С-Н групп в области 2942 см^{-1} и свободных карбоксильных групп при 1609 см^{-1} . Полное сопоставление полос поглощения спектров рабочего и стандартного образца указывает на идентичность веществ (рисунок 37).

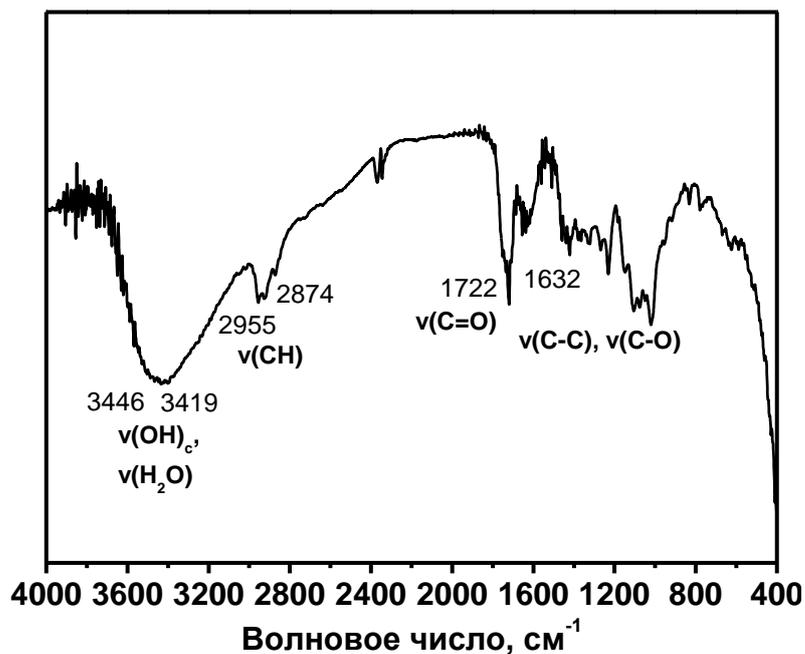


Рисунок 36 – ИК-спектр субстанции П/ИБП 6

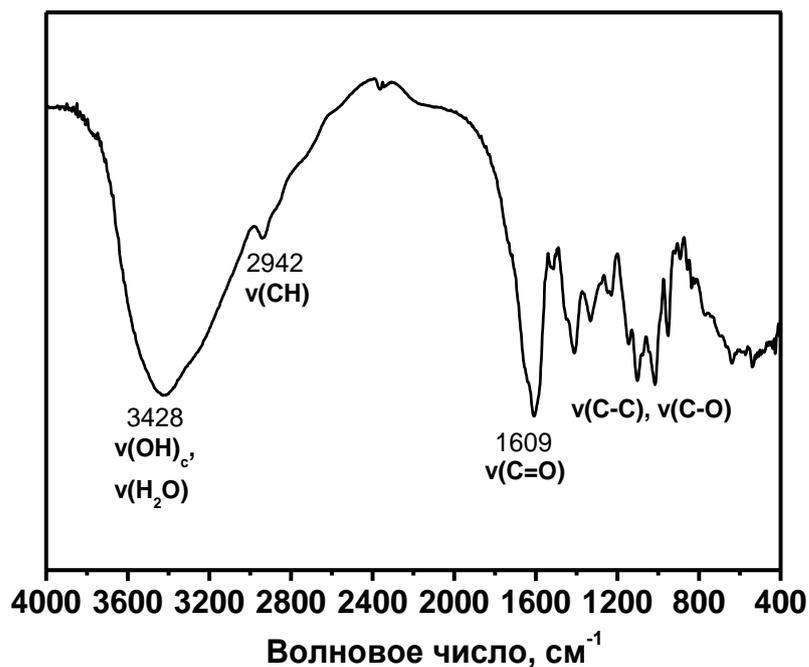


Рисунок 37 – ИК-спектр субстанции ПГNa/ТС 5

В УФ-спектрах водного раствора П/ИБП 6 (концентрация 0.05%) в области от 200 до 400 нм наблюдается плечо при 224 ± 2 нм (рисунок 38). УФ-спектр водного раствора ПГNa/ТС 5 (концентрация 0.05%, рисунок 39) в области от 200 до 400 нм характеризуется полосами поглощения при 276 ± 2 нм, 357 ± 2 нм и менее четко выраженным пиком при 216 ± 2 нм. Кроме того, в спектре ПГNa/ТС 5 наблюдается плечо при 246 ± 2 нм. Соотношение D_{276}/D_{357} составляет от 1.05 до 1.09.

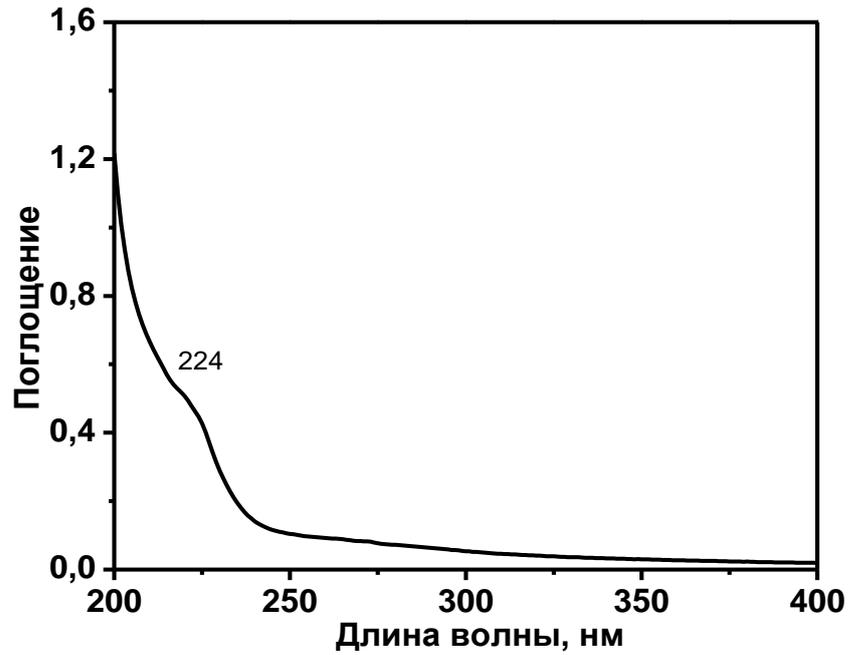


Рисунок 38 – УФ-спектр субстанции П/ИБП 6

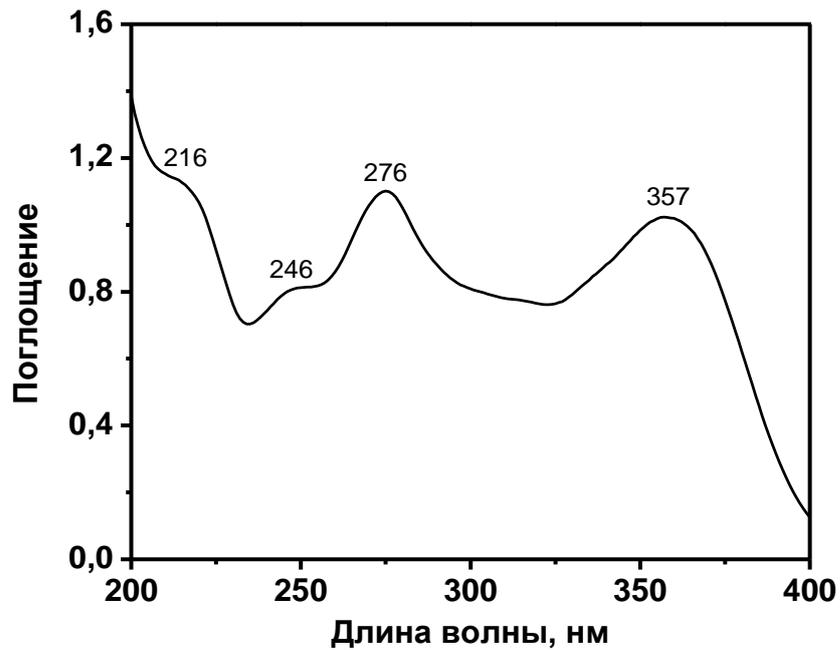


Рисунок 39 – УФ-спектр субстанции ПГNa/ТС 5

Также для подтверждения идентичности образца может быть использован метод поляриметрии. Удельный угол вращения плоскости поляризации 0.5%-о водного раствора комплексов П/ИБП 6 и ПГNa/ТС 5 (в пересчёте на сухое вещество) при длине волны 589 нм (длина кюветы 62 мм) должен быть не менее $+150 (^{\circ}) \cdot \text{мл} \cdot \text{дм}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ и не более $+180 (^{\circ}) \cdot \text{мл} \cdot \text{дм}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$.

3.2 Методы количественного определения полученных соединений

3.2.1 Методика определения ибупрофена в П/ИБП 6

Количественное определение ибупрофена в комплексе П/ИБП 6 проводили методом титриметрии.

Приготовление испытуемого раствора: 0.5 г субстанции помещают в колбу вместимостью 250 мл, растворяют в 100 мл дистиллированной воды, перемешивают на магнитной мешалке в течение двух часов при комнатной температуре, затем повышают температуру до 55°C и перемешивают еще в течение часа при этой температуре. Выключают нагрев и перемешивание, снимают колбу с мешалки и охлаждают до комнатной температуры. Фильтруют раствор через бумажный фильтр.

Приготовление контрольного раствора: 0.5 г пересажженного цитрусового пектина помещают в колбу вместимостью 250 мл, растворяют в 100 мл дистиллированной воды, перемешивают на магнитной мешалке в течение двух часов при комнатной температуре, затем повышают температуру до 55 °С и перемешивают еще в течение часа при этой температуре. Выключают нагрев и перемешивание, снимают колбу с мешалки и охлаждают до комнатной температуры. Фильтруют раствор через бумажный фильтр.

Титруют испытуемый и контрольный растворы с помощью 0.1 М раствора гидроксида натрия до появления розового окрашивания (индикатор – 0,1 %-й раствор фенолфталеина).

1 мл 0.1 М раствора натрия гидроксида соответствует 20,63 мг ибупрофена.

3.2.2 Методика определения тетрациклина в ПГNa/ТС 5

Количественное определение тетрациклина в комплексе ПГNa/ТС 5 проводили методом автоматического элементного анализа. Элементный анализ осуществлялся на CHNS анализаторе EuroEA3028-НТ-ОМ производства «Eurovector SpA» (Италия). Параллельно происходило определение содержания азота в контрольном образце – пектате натрия, и в испытуемом образце – комплексе ПГNa/ТС 5. Образцы взвешивались на микровесах Sartorius CP2P (Germany) в оловянных капсулах. Для

проведения количественных измерений, оценки полученных данных использовалось программное обеспечение Callidus 4.1.

3.3 Испытания на микробиологическую чистоту

Для полученных субстанций были проведены испытания на микробиологическую чистоту. Испытания проводили при участии научной группы с.н.с., к.б.н., заведующей лабораторией микробиологии Волошиной А.Д. ИОФХ им. Арбузова – ОСП ФИЦ КазНЦ РАН.

Согласно ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» (ГФ XIV, ч. 1, с. 1129), п. 3А «Твердые (неводные) препараты для приема внутрь»:

- общее число аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г;
- общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г;
- отсутствие *Escherichia coli* в 1 г.

В ходе испытаний комплексов **П/ИБП 6** и **ПГNa/ТС 5** было установлено, что содержание общего числа аэробных микроорганизмов, а также дрожжевых и плесневых грибов составляет <10 КОЕ в 1 г; *Escherichia coli* в 1 г субстанций отсутствует (приложения 7 и 8).

ГЛАВА 4. Экспериментальная часть

4.1 Материалы

В работе использованы: пектин цитрусовый («Herbstreith & Fox», Германия, молекулярная масса 17.6 кДа, содержание галактуроновой кислоты 85%, степень этерификации 65%, содержание свободных карбоксильных групп 10%), препарат «аспирин» («Шандонг Ксинхуа фармфабрика», Китай), препарат «ибупрофен» производства («Татхимфармпрепараты», Россия, ФС 2.1.0100.18), фармсубстанция тетрациклина гидрохлорида «Татхимфармпрепараты» (ФС 42-2519-97), препарат «Амоксикар» 80% («Промветсервис», Беларусь); спирт этиловый (96%).

4.2 Методика получения комплексов пектина с НПВС

4.2.1 Методика получения комплексов пектина с ибупрофеном

Взаимодействием 2% водного раствора пектина с растворами ибупрофена в водном этаноле были получены соединения включения – комплексы П/ИБП 1–8. Для установления стехиометрии и определения максимального связанного количества ибупрофена проведена серия экспериментов, в которых массовое соотношение пектина и лекарственного препарата варьируется в пределах 40 : 1 – 1 : 1 (таблица 19).

Таблица 19 – Характеристические данные к синтезу комплексов пектин : ибупрофен

Образец	Соотношение массы пектина к массе ибупрофена	Количество связанного ибупрофена, масс. %	Растворимость, %
Контроль	-	-	100.00
П/ИБП 1	40.0 : 1	74.58	100.00
П/ИБП 2	20.0 : 1	87.95	99.75
П/ИБП 3	13.3 : 1	55.23	99.33
П/ИБП 4	8.0 : 1	73.32	97.33
П/ИБП 5	6.7 : 1	79.71	96.00
П/ИБП 6	5.7 : 1	85.94	95.33
П/ИБП 7	5.0 : 1	75.86	95.33
П/ИБП 8	4.4 : 1	78.90	95.33

Осаждение полученных комплексов пектина с ибупрофеном и дополнительное промывание несвязанного в комплекс ибупрофена проводили этиловым спиртом. Количественное содержание ибупрофена в водном этаноле после центрифугирования определялось титриметрическим методом согласно методике, описанной в ФС 2.1.0100.18.

Полученные соединения не имели запаха и представляли собой аморфные порошки светло-бежевого цвета, растворимые в воде при 50–60°C. Все комплексы **П/ИБП 1-8** оптически активны.

Комплекс П/ИБП 1. Массовое отношение исходных реагентов пектин:ибупрофен было равно 40:1. $[\alpha]_D^{20} = +180$ (*c* 0.5; H₂O). ИК спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3403, 2930, 1748 (C=O), 1625, 1443, 1369, 1332, 1235, 1149, 1103, 1077, 1017, 914, 832, 767, 637, 589, 535.

Комплекс П/ИБП 2. Массовое отношение пектин : ибупрофен равно 20:1. $[\alpha]_D^{20} = +177$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3403, 2930, 1748 (C=O), 1625, 1443, 1369, 1332, 1235, 1149, 1103, 1077, 1017, 914, 832, 767, 637, 589, 535.

Комплекс П/ИБП 3. Массовое отношение пектин:ибупрофен равно 13.3:1. $[\alpha]_D^{20} = +173$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3429, 2925, 1746(C=O), 1634, 1445, 1370, 1331, 1233, 1149, 1103, 1015, 920, 832, 764, 636, 588, 533, 478, 422.

Комплекс П/ИБП 4. Массовое отношение пектин:ибупрофен равно 8:1. $[\alpha]_D^{20} = +164$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3396, 2925, 1748(C=O), 1723, 1636, 1508, 1421, 1367, 1331, 1232, 1105, 1076, 1015, 919, 849, 832, 769, 637, 590, 535, 421.

Комплекс П/ИБП 5. Массовое отношение пектин:ибупрофен равно 6.7:1. $[\alpha]_D^{20} = +160$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3435, 2954, 2925, 2873, 2737, 2175, 1911, 1722(C=O), 1630, 1509, 1456, 1421, 1377, 1327, 1237, 1232, 1149, 1106, 1076, 1015, 954, 850, 831, 777, 667, 634, 588, 561, 529, 455, 426.

Комплекс П/ИБП 6. Массовое отношение пектин:ибупрофен равно 5.7:1. $[\alpha]_D^{20} = +151$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3446, 3047, 3022, 2955, 2924, 2872, 2734, 2636, 2163, 2036, 1911, 1722(C=O), 1632, 1509, 1458, 1421, 1379, 1326, 1269, 1231, 1181, 1150, 1105, 1075, 1014, 952, 850, 831, 778, 686, 667, 634, 589, 562, 526, 485, 451, 423.

Комплекс П/ИБП 7. Массовое отношение пектин:ибупрофен равно 5:1. $[\alpha]_D^{20} = +155$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3405, 3046, 2955, 2924, 2872, 2735, 2634, 2175, 1912, 1721(C=O), 1633, 1509, 1457, 1421, 1379, 1326, 1268, 1231, 1182, 1149, 1107, 1074, 1013, 951, 850, 831, 778, 668, 635, 588, 525, 483, 424.

Комплекс П/ИБП 8. Массовое отношение пектин:ибупрофен равно 4.4:1. $[\alpha]_D^{20} = +156$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3437, 3049, 3021, 2955, 2924, 2873, 2733, 2636, 1721(C=O), 1632, 1509, 1458, 1421, 1379, 1326, 1268, 1231, 1182, 1150, 1102, 1074, 1013, 951, 850, 831, 778, 667, 634, 589, 526, 485, 422.

4.2.2 Методика получения комплексов пектина с аспирином

Для установления стехиометрии и определения максимального связанного количества аспирина проведена серия экспериментов, в которых массовое соотношение пектина и лекарственного препарата варьируется в пределах 40 : 1 – 2 : 1 (таблица 20). Осаждение полученных комплексов П/АСК 1-7 и дополнительное промывание несвязанной в комплекс ацетилсалициловой кислоты проводили этиловым спиртом. Количественное содержание аспирина в водном этаноле после центрифугирования

определялось титриметрическим методом согласно методике, описанной в ФС.2.1.0006.15.

Полученные соединения **П/АСК 1-7** не имели запаха и представляли собой аморфные порошки светло-бежевого цвета. Все комплексы оптически активны.

Таблица 20 – Характеристические данные к синтезу комплексов П/АСК

Образец	Соотношение массы пектина к массе ацетилсалициловой кислоты	Количество связанного аспирина, масс. %
Контроль	-	-
П/АСК 1	40.0 : 1	92.82
П/АСК 2	13.3:1	70.99
П/АСК 3	8.0 : 1	62.69
П/АСК 4	5.3 : 1	60.00
П/АСК 5	4.0 : 1	61.38
П/АСК 6	2.7 : 1	55.16
П/АСК 7	2.0 : 1	54.23

Комплекс П/АСК 1. Массовое отношение пектин: АСК равно 40:1. $[\alpha]_D^{20} = +180$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3407, 2934, 1747 (C=O), 1636, 1442, 1418, 1371, 1331, 1236, 1147, 1103, 1078, 1016, 913, 833, 763, 636, 588, 535.

Комплекс П/АСК 2. Массовое отношение пектин: АСК равно 13.3:1. $[\alpha]_D^{20} = +183$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3370, 2930, 1751(C=O), 1636, 1441, 1370, 1309, 1236, 1193, 1147, 1103, 1016, 918, 833, 756, 636, 535.

Комплекс П/АСК 3. Массовое отношение пектин: АСК равно 8:1. $[\alpha]_D^{20} = +176$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3424, 2929, 1753(C=O), 1692, 1607, 1458, 1419, 1371, 1306, 1223, 1190, 1102, 1014, 918, 832, 756, 705, 635, 597, 535.

Комплекс П/АСК 4. Массовое отношение пектин: АСК равно 5.3:1. $[\alpha]_D^{20} = +178$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3430, 2929, 1753 (C=O), 1693, 1606, 1458, 1419, 1372, 1308, 1222, 1189, 1147, 1096, 1014, 917, 832, 804, 756, 705, 666, 638, 599, 535, 424.

Комплекс П/АСК 5. Массовое отношение пектин: АСК равно 4:1. $[\alpha]_D^{20} = +174$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3409, 2929, 2703, 2588, 2031, 1754(C=O), 1693, 1634, 1606, 1484, 1458, 1419, 1371, 1307, 1257, 1222, 1189, 1146, 1097, 1014, 918, 832, 804, 791, 736, 705, 667, 633, 599, 565, 536, 516, 472, 425.

Комплекс П/АСК 6. Массовое отношение пектин: АСК равно 2.7:1. $[\alpha]_D^{20} = +144$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3414, 2925, 2702, 2588, 2549, 2040, 1968, 1754 (C=O), 1692, 1606, 1577, 1484, 1458, 1438, 1419, 1371, 1307, 1257, 1221, 1188, 1135, 1096, 1014, 970, 918, 840, 804, 791, 756, 705, 667, 644, 599, 564, 536, 516, 485, 461, 440, 424.

Комплекс П/АСК 7. Массовое отношение пектин: АСК равно 2:1. $[\alpha]_D^{20} = +171$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3417, 2925, 2702, 2588, 2547, 1754 (C=O), 1692, 1606, 1484, 1458, 1438, 1419, 1371, 1257, 1221, 1188, 1135, 1096, 1014, 970, 917, 840, 804, 791, 756, 705, 667, 642, 599, 563, 535, 515, 461, 441, 423.

4.3. Методика получения комплексов полигалактуроната натрия с противомикробными препаратами

4.3.1 Методика получения комплексов полигалактуроната натрия с гидрохлоридом тетрациклина

Методика получения полигалактуроната натрия

Для получения полигалактуроната натрия (ПГNa) 2%-й раствор цитрусового пектина (900 мл) был обработан 0.625 М раствором NaOH (100 мл) в течение 2 ч при температуре 50°C и скорости вращения мешалки 250 об/мин. Далее полученный ПГNa (рН 9.94, 20 °С) из реакционной среды осаждали этиловым спиртом (соотношение 1:2), центрифугировали (4000 об/мин, 30 минут) и дополнительно промывали 96%-ным этиловым спиртом (100 мл), высушивали (1 атм, 55°C, 7 ч) и измельчали.

Получение данной соли проводилось при контролируемых значениях рН при титриметрическом переходе рН из кислой в щелочную область. Наряду с контролем рН при разработке способа получения этой соли параллельно использовался контроль за состоянием карбоксильных групп методом ИК спектроскопии в области валентных колебаний группы COO⁻ (1660-1800 см⁻¹).

Методика получения комплексов полигалактуроната натрия с тетрациклином

Для получения полигалактуроната натрия (ПГNa) 2%-ный раствор цитрусового пектина (900 мл) был обработан 0.625 М раствором NaOH (100 мл) в течение 2 ч при температуре 50°C и скорости вращения мешалки 250 об/мин. Затем полученный водный раствор ПГNa смешивали с водными растворами гидрохлорида тетрациклина (ТС·HCl) при варьировании концентрации ТС·HCl и перемешивали в течение 2 ч при температуре 50°C и скорости вращения мешалки 350 об/мин. В результате были получены комплексы ПГNa/ТС (образцы 1–5) в виде растворов.

Впоследствии полученные продукты из реакционной среды осаждали этиловым спиртом (соотношение 1:2), центрифугировали (4000 об/мин, 30 мин) и дополнительно промывали 96%-ным этиловым спиртом (100 мл) для очистки комплексов от физически сорбированного тетрациклина, высушивали (1 атм, 55 °С, 7 ч) и измельчали. Далее приготовили водные растворы ПГNa и комплексов ПГNa/ТС и методом атомно-адсорбционной спектроскопии определили содержание натрия в ПГNa, в комплексах ПГNa/ТС и в супернатантах, после чего рассчитали процент связывания тетрациклина в комплексах (таблица 10).

Полученные соединения не имели запаха и представляли собой аморфные порошки светло-бежевого цвета, растворимые в воде при 50–60°C. Все продукты оптически активны (таблица 11).

ПГNa. $[\alpha]_D^{20} +189$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3852, 3437, 2929, 2152, 1616, 1417, 1335, 1243, 1145, 1102, 1016, 954, 916, 894, 836, 772, 641, 540, 486, 466, 434.

ПГNa/ТС 1. Массовое отношение исходных реагентов ПГNa: гидрохлорид тетрациклина было равно 8.0:1.0. $[\alpha]_D^{20} +183$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3435, 2929, 2352, 2153, 1615, 1506, 1418, 1334, 1244, 1144, 1101, 1017, 954, 917, 893, 837, 773, 642, 596, 541, 420. Найдено, %: С 32.26, Н 4.39, N 0.28.

ПГNa/ТС 2. Массовое отношение исходных реагентов ПГNa : гидрохлорид тетрациклина было равно 5.7:1.0. $[\alpha]_D^{20} +187$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3436, 2928, 2376, 1617, 1508, 1419, 1333, 1244, 1144, 1101, 1015, 954, 894, 837, 637, 539, 485. Найдено, %: С 32.35, Н 4.52, N 0.32.

ПГNa/ТС 3. Массовое отношение исходных реагентов ПГNa : гидрохлорид тетрациклина было равно 4.4:1.0. $[\alpha]_D^{20} +165$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3854, 3435,

2938, 2361, 1610, 1413, 1333, 1233, 1146, 1102, 1015, 953, 893, 837, 639, 538, 447, 428. Найдено, %: С 34.32, Н 4.79, N 0.33.

ПГNa/ТС 4. Массовое отношение исходных реагентов ПГNa : гидрохлорид тетрациклина было равно 3.6:1.0. $[\alpha]_D^{20} +163$ (с 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3855, 3426, 2943, 1610, 1413, 1333, 1231, 1145, 1102, 1016, 952, 892, 634, 537, 429. Найдено, %: С 33.16, Н 5.05, N 0.38.

ПГNa/ТС 5. Массовое отношение исходных реагентов ПГNa : гидрохлорид тетрациклина было равно 3.1:1.0. $[\alpha]_D^{20} +159$ (с 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3855, 3428, 2942, 1609, 1514, 1411, 1333, 1230, 1145, 1102, 1016, 952, 892, 857, 836, 639, 539, 426. Найдено, %: С 34.34, Н 5.50, N 0.39.

Тест «Растворение» ФС 1.4.2.0014.15

Определение оптической плотности стандартного раствора гидрохлорида тетрациклина

В 10 мл фосфатного буферного (ФБ) раствора (ОФС.1.3.0003.15 Буферные растворы, фосфатный забуференный физиологический раствор, рН 7.4) приготовили раствор гидрохлорида тетрациклина путем растворения точной навески (0.005 г). Концентрация гидрохлорида тетрациклина в ФБ составила $5 \cdot 10^{-4}$ г/мл. Затем в мерную колбу вместимостью 10 мл внесли по 4.00, 2.00, 1.00, 0.50 и 0.25 мл исходного раствора и довели до метки ФБ. Получили растворы гидрохлорида тетрациклина с концентрацией $2.00 \cdot 10^{-4}$, $1.00 \cdot 10^{-4}$, $5.00 \cdot 10^{-5}$, $2.50 \cdot 10^{-5}$, $1.25 \cdot 10^{-5}$ г/мл соответственно.

Определение оптической плотности растворов гидрохлорида тетрациклина

Зарегистрировали УФ спектры растворов гидрохлорида тетрациклина в кварцевых кюветах (10 мм) в диапазоне от 200 до 600 нм. В фосфатном буфере наблюдается ярко выраженный максимум поглощения при 276 ± 3 нм. Данная длина волны (276 нм) была выбрана в качестве аналитической, относительно нее был построен калибровочный график зависимости поглощения от концентрации гидрохлорида тетрациклина (рисунок 24).

Растворение в фосфатном буфере

Первая серия экспериментов

Точную навеску комплекса **5** (0.134 г), содержащего 8.95 мг основания тетрациклина (6.68%), помещали в круглодонную колбу, содержащую 100 мл ФБ (рН 7.4) при температуре $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Растворение проводили при постоянном перемешивании (100 об/мин) на роторном вакуумном испарителе, отбирали пробы объемом 10 мл через определенные временные интервалы (10; 20; 30; 45; 60; 90; 120; 180; 240 мин) и доводили объем раствора до 100 мл ФБ. УФ-спектры аликвот регистрировали в диапазоне от 200 до 600 нм и с помощью калибровочного графика (рисунок 36) определяли профиль высвобождения ТС.

Вторая серия экспериментов

Точную навеску комплекса **3** (0.172 г), содержащего 10.00 мг основания тетрациклина (5.81%), помещали в круглодонную колбу, содержащую 100 мл ФБ (рН 7.4) при температуре $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Растворение проводили при постоянном перемешивании (100 об/мин) на роторном вакуумном испарителе, отбирали пробы объемом 5 мл через определенные временные интервалы (5; 10; 20; 30; 45; 60; 90; 120; 180 мин) и доводили объем раствора до 100 мл ФБ. УФ-спектры аликвот регистрировали в диапазоне от 200 до 600 нм и с помощью калибровочного графика (рисунок 40) определяли профиль высвобождения ТС.

Третья серия экспериментов

Точную навеску комплекса **3** (0.172 г), содержащего 10.00 мг основания тетрациклина (5.81%), спрессовали и сформировали из нее таблетку. Поместили таблетку в круглодонную колбу, содержащую 100 мл ФБ (рН 7.4) при температуре $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Растворение проводили при постоянном перемешивании (100 об/мин) на роторном вакуумном испарителе, отбирали пробы объемом 5 мл через определенные временные интервалы (5; 10; 20; 30; 45; 60; 90; 120; 180 мин) и доводили объем раствора до 100 мл ФБ. УФ-спектры аликвот регистрировали в диапазоне от 200 до 600 нм и с помощью калибровочного графика (рисунок 40) определяли профиль высвобождения ТС.

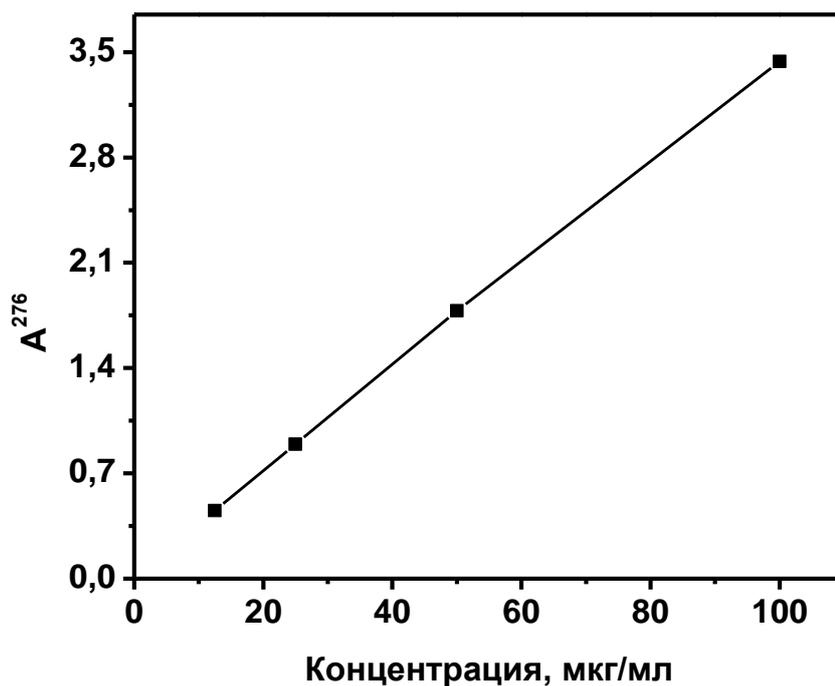


Рисунок 40 – Калибровочный график зависимости поглощения при 276 нм от концентрации гидрохлорида тетрациклина (фосфатный буферный раствор, рН 7.4)

4.3.2 Методика получения комплексов полигалактуроната натрия с амоксициллином

Для получения комплексов полигалактуроната натрия с амоксициллином 2%-й раствор полигалактуроната натрия был приготовлен путем растворения точной навески 1 г ПГNa (на основе цитрусового пектина) в 50 мл дистиллированной воды в течение 2 ч при комнатной температуре и скорости вращения мешалки 350 об/мин. Параллельно растворили в 9, 13 и 17 мл 0.1 М соляной кислоты 0.228, 0.326 и 0.424 г препарата «Амоксикар», содержащего 80% амоксицилина, соответственно. Затем полученный водный раствор ПГNa смешивали с растворами, содержащими гидрохлорид амоксицилина при варьировании концентрации последнего, и перемешивали в течение 2 ч при температуре 50°C и скорости вращения мешалки 350 об/мин. В результате были получены комплексы ПГNa/АХ (образцы **1–3**) в виде растворов.

Впоследствии полученные продукты из реакционной среды осаждали этиловым спиртом (соотношение 1:2), центрифугировали (4000 об/мин, 30 минут) и

дополнительно промывали 96%-ным этиловым спиртом (100 мл) для очистки комплексов от физически сорбированного амоксициллина, высушивали (1 атм, 55°C, 7 ч) и измельчали. Далее приготовили водные растворы ПГNa и комплексов ПГNa/АХ и исследовали их физико-химические свойства (таблица 13).

Полученные соединения не имели запаха и представляли собой аморфные порошки светло-бежевого цвета, растворимые в воде при 50–60°C. Все продукты оптически активны (таблица 13).

ПГNa. $[\alpha]_{D^{20}} +189$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3852, 3437, 2929, 2152, 1616, 1417, 1335, 1243, 1145, 1102, 1016, 954, 916, 894, 836, 772, 641, 540, 486, 466, 434.

ПГNa/АХ 1. Массовое отношение исходных реагентов ПГNa: амоксициллин было равно 5.7:1.0. $[\alpha]_{D^{20}} +207$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3434, 2929, 1615, 1417, 1332, 1244, 1146, 1101, 1015, 953, 836, 770, 642. Найдено, %: С 29.86, Н 5.16, N 0.49.

ПГNa/АХ 2. Массовое отношение исходных реагентов ПГNa : амоксициллин было равно 4.0:1.0. $[\alpha]_{D^{20}} +206$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3425, 2928, 2368, 1610, 1420, 1332, 1243, 1147, 1100, 1016, 952, 892, 836, 769, 643. Найдено, %: С 29.96, Н 5.14, N 0.71.

ПГNa/АХ 3. Массовое отношение исходных реагентов ПГNa : амоксициллин было равно 3.1:1.0. $[\alpha]_{D^{20}} +201$ (*c* 0.5; H₂O). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3444, 2940, 2359, 1774, 1609, 1519, 1416, 1332, 1246, 1146, 1102, 1016, 955, 894, 837, 772, 641, 540, 428. Найдено, %: С 30.01, Н 5.15, N 0.91.

4.4 Методы физико-химического анализа пектина и комплексов на его основе

4.4.1 ИК-спектроскопия

ИК-спектры записаны на ИК-Фурье спектрометре Tensor-27 («Bruker», Германия). Съемка велась при разрешении 4 см^{-1} (интервал 4000-400 см^{-1}) в таблетках с KBr.

4.4.2 УФ-спектроскопия

УФ-спектры были сняты на спектрофотометре Lambda 35 («Perkin Elmer, Inc.», США) в виде водных либо спиртовых растворов веществ (концентрация $1 \cdot 10^{-4}$ М) в интервале 200–600 нм.

4.4.3 ЯМР-спектроскопия

^{13}C ЯМР- спектры получены на приборах Avance-600 (150.9 МГц, «Bruker», Германия) и Avance-400 (100.6 МГц, «Bruker», Германия): пектина, тетрациклина и комплексов П/АСК, П/ИБП, ПГNa/ТС и ПГNa/АХ (D_2O), ибупрофена и АСК (спирт метиловый – D_4).

4.4.4 Рентгеновская порошковая дифрактометрия

Порошковые дифрактограммы полученных соединений были получены на рентгеновском дифрактометре D8 Advance («Bruker», Германия) при угловой скорости $4^\circ/\text{мин}$ в диапазоне 2θ от 3° до 66° .

4.4.5 Динамическое рассеяние света

Самоорганизация водных растворов комплексов П/АСК, П/ИБП и ПГNa/ТС была изучена методом динамического рассеяния света (ДРС) и микроэлектрофореза (анализатор Zetasizer Nano ZS, «Malvern Instruments», США) при концентрации 0.15%. Все образцы были приготовлены на деионизированной воде (система очистки воды Simplicity UV, «Millipore», США). Для обеспыливания образцов в соответствии с методикой использовали одноразовые фильтры Iso-Disc N-25-4 Nylon («Supelco», США).

4.4.6 Сканирующая электронная микроскопия

Морфологические исследования образцов П/АСК и П/ИБП проводились на электронном микроскопе ТМ–1000 («НИТАСНИ», Япония). Измерения для комплексов полигалактуроната натрия с тетрациклином были проведены на сканирующем электронном микроскопе полевой эмиссии (SU8000, «Hitachi», Япония). Изображения были получены в режиме вторичных электронов при ускоряющем напряжении 1 или 2 кВ.

4.4.7 Элементный анализ

Элементный анализ осуществлялся на CHNS анализаторе Vario Macro cube производства Elementar Analysensysteme GmbH (Германия). Образцы взвешивались на микровесах Sartorius Cubis II (Германия) в оловянных капсулах. Для проведения количественных измерений и оценки полученных данных использовалось программное обеспечение VarioMacro Software V4.0.11.

Расчеты содержания тетрациклина и амоксициллина проводились на основе данных элементного анализа в программе Microsoft Excel 2020.

4.4.8 Термогравиметрия, совмещенная с дифференциальной сканирующей калориметрией (ТГ/ДСК)

Для исследования термического разложения использовали сопряженную систему прибора синхронного термического анализа ТГ/ДСК STA449-F3 («Netzsch», Германия) с ИК-Фурье спектрометром Tensor 27 («Bruker», Германия). Исследуемые образцы (8.2-16.2 мг) помещали в алюминиевые тигли с перфорированной крышкой и нагревали до 30-350°C вместе с пустым тиглем в качестве образца сравнения. Измерения ТГ/ДСК проводили при скорости нагревания 10 К/мин в потоке аргона 50 мл/мин. Разрешение Tensor 27 – 4 см⁻¹. Газовая ячейка и транспортная линия между ТГ/ДСК и ИК-Фурье спектрометром были нагреты до 200 и 195°C, соответственно.

4.5 Исследования биологической активности молекулярных комплексов пектина с НПВС

4.5.1 Исследования биологической активности молекулярных комплексов пектина с ибупрофеном

Лабораторные животные

Фармако-токсикологические исследования были выполнены на лабораторных животных – аутбредных белых мышах ICR (CD-1) и крысах Wistar, приобретенных в НПП Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН (Пущино).

Животных содержали в стандартных условиях вивария [112] с 12-часовым световым днем и неограниченным доступом к еде и воде. В качестве корма использовали полнорационный гранулированный корм для грызунов с содержанием белка 22%, клетчатки не более 4%, жира не более 5%, золы не более 9%, влажности не более 13.5%, калорийностью 295 ккал/100 г.

Оценка острой токсичности

Острую токсичность молекулярного комплекса **П/ИБП 6** сравнивали с таковой лекарственной субстанции препарата ибупрофен производства «Татхимфармпрепараты» (ФС 2.1.0100.18) в эквимольных дозах. Исследование выполняли на белых мышах.

Для определения острой токсичности ибупрофена вводили лабораторным мышам обоего пола массой 25-30 г, перорально в виде 10% растворов в чистом 100% ДМСО, приготовленных непосредственно перед введением. Для каждой дозы были использованы группы по 6 мышей.

Вводимые дозы ибупрофена:

1000 мг/кг (вводимый объем 0.1 мл на 10 г массы, или 10 мл/кг)

2000 мг/кг (вводимый объем 0.2 мл на 10 г массы, или 20 мл/кг)

3000 мг/кг (вводимый объем 0.3 мл на 10 г массы, или 30 мл/кг)

Токсичность ДМСО для мышей (ЛД₅₀) больше 40 г/кг при в/б введении, т.е. в исследованных дозах ДМСО не токсично и не могло повлиять на результат исследования. Наблюдение за животными проводили в течение 3 дней, во всех группах остались живы все мыши, т.е. токсичная доза ибупрофена не определена.

Комплекс пектина с ибупрофеном **П/ИБП 6** вводили мышам в виде 3% водного раствора. Из-за большого объема вводимой жидкости, раствор комплекса вводили в течение часа в физиологически допустимых объемах. В течение часа ввели общее количество вещества из расчета 8400 мг/кг, что эквивалентно 1100 мг/кг ибупрофена (при содержании ибупрофена в комплексе 13%). Суммарный объем вводимой жидкости за час составил 2.8 мл на 10 г массы (280 мл/кг). Наблюдение за животными проводили в течение 3 дней.

В результате в исследованной группе остались живы все мыши, т.е. токсичная доза комплекса пектина с ибупрофеном **П/ИБП 6** не определена. Учитывая, что летальная доза комплекса выше 5000 мг/кг, его можно отнести к VI классу («относительно безвредных») веществ.

Оценка ulcerогенных свойств

Ульцерогенное действие комплекса **П/ИБП 6** было исследовано при однократном внутрижелудочном введении в виде суспензий на твине 80 крысам, лишенным пищи за 16 ч до исследования. По окончании введения препаратов, мышей через 3 ч подвергали эвтаназии, извлекали желудки, рассекали их по малой кривизне и промывали в физиологическом растворе для удаления содержимого и исследовали под бинокулярным микроскопом с цифровой камерой Nikon.

Эксперименты проводили на белых крысах, разделенных на 4 группы по 6 особей в каждой. Первая группа служила контролем, которой вводили твин 80. Остальным группам животных вводили исследуемые вещества. Вторая группа получала внутрижелудочно ибупрофен в дозе 1500 мг/кг, третья – пектин в дозе 10038 мг/кг, четвертая – 11538 мг/кг комплекса ибупрофена и пектина **П/ИБП 6**, содержащего 13% ибупрофена.

Оценку ульцерогенного эффекта **П/ИБП 6** проводили по 4-балльной шкале: 0 – отсутствие повреждений; 0,5 – гиперемия; 1 – единичные незначительные повреждения (1 или 2 точечных кровоизлияния); 2 – множественные повреждения (эрозии, точечные кровоизлияния); 3 – значительные и множественные повреждения слизистой (эрозии, кровоизлияния); 4 – грубые повреждения, охватывающие всю поверхность слизистой (массивные кровоизлияния, эрозии, перфорации). Результаты представлены в таблице 7.

Исследование противовоспалительных свойств

Для оценки влияния исследуемых препаратов изучено действие при внутрижелудочном введении, поскольку пероральный путь введения является терапевтическим способом применения препаратов и планируется в клинических исследованиях. Исследуемые комплексы и фармакологические субстанции животным вводили в смеси с твин-80 в объеме суспензии 2 см³, внутрижелудочно с применением гибкого зонда с последующим введением водной нагрузки.

Навески препарата взвешивали отдельно для каждого животного, рассчитывали индивидуально для каждого животного, основываясь на массе тела, зарегистрированной непосредственно перед введением вещества. Введение животным осуществляли натощак, для чего предварительно за 12 часов убирали кормушку с кормом. Доступ к корму возобновляли через час после введения.

Исследуемые препараты вводили однократно. Дозировки фармакологических субстанций составляли 1000 мг/кг массы тела (200 мг/животное массой тела 200 г). Дозировка комплексов рассчитывалась эквивалентно основному веществу.

Было сформировано четыре группы крыс по 15 особей в каждой (таблица 21).

Таблица 21 – Дизайн исследования

Номер группы	Вводимый препарат	Доза по основному веществу мг/кг массы тела	Количество крыс
Группа № 1	ИБП	1000	15
Группа № 2	П/ИБП 6	1000	15

Отбор проб крови с последующим отделением плазмы проводили через 1.0; 2.0; 4.0; 8.0 и 24.0 ч после введения препарата. На каждую точку отбора в соответствии с ТЗ было предусмотрено по три белой крысы. Отделенную плазму помещали в маркированные пробирки и до момента анализа все образцы хранили при минус 35°С.

Индикацию в плазме крови проводили по следующей методике. К 1 мл плазмы крови с исследуемым веществом, разведенной водой очищенной до 3 мл, добавляли 10%-й раствор вольфрамата натрия 10%-м в растворе серной кислоты до рН среды 2 по универсальному индикатору, перемешивали, центрифугировали 3 мин при скорости 3000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в делительную воронку,

устанавливали определенное значение рН среды, прибавляли 5 мл экстрагента и экстрагировали трижды в течение 5 мин. Извлечения объединяли, фильтровали через слой натрия сульфата безводного в фарфоровые чашки, и растворитель выпаривали до сухого остатка. Подтверждение наличия ибупрофена в биологических жидкостях методом тонкослойной хроматографии осуществляли на пластинках Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ. Использовали систему “хлороформ – этанол – 25%-й раствор гидроксида аммония” (32:7:1), как лучшую отработанную в результате экспериментальных исследований для вещественных доказательств. Детекцию проводили в УФ свете. При этом наблюдались пятна, соответствующие ибупрофену по значению R_f , окраске и флюоресценции. В качестве стандартов использовали точные концентрации субстанции ибупрофена. Последующая оценка (валидация) методики показала, что полнота извлечения из плазмы крови составила 79%, предел обнаружения исследуемого вещества подобранным методом ТСХ составил 5 мкг/мл. Результаты исследований представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Концентрация ибупрофена в плазме крови белых крыс на фоне однократного внутрижелудочного введения ИБП и **П/ИБП 6** в дозе 1000 мг/кг массы тела ($M \pm m$, $n=3$)

Время исследования, ч	Группа животных / концентрация ибупрофена, мг/мл	
	1 (ИБП)	2 (П/ИБП 6)
1	3.91 ± 0.56	0.58 ± 0.08 *
2	5.66 ± 0.8	1.74 ± 0.24 *
4	9.51 ± 1.34	4.38 ± 0.62 *
8	7.68 ± 1.09	6.66 ± 0.94
24	2.37 ± 0.34	5.84 ± 0.82 *

*Примечание:** – статистически значимые отличия от группы № 1

По результатам исследования построили усреднённые фармакокинетические кривые ибупрофена и тетрациклина в плазме крови белых крыс после однократного перорального введения с вычислением следующих фармакокинетических параметров изучаемого действующего вещества: C_{max} – максимальная концентрация (мкг/мл), T_{max} – время достижения максимальной концентрации, $T_{1/2}$ – период полувыведения, время, за

которое максимальная концентрация препарата в плазме (сыворотке) уменьшается вдвое, $AUC_{(0-t)}$ - площадь под фармакокинетической кривой и f - относительная биодоступность (степень всасывания).

Для полученных результатов приводили значения средних (M) и стандартных ошибок среднего арифметического ($\pm SEM$). Для оценки статистической значимости межгрупповых различий использовали тест Краскела–Уоллиса; критическим уровнем статистической значимости принимали $p = 0,05$.

Исследование противовоспалительных свойств комплексов пектина с ибупрофеном

Для комплекса **П/ИБП 6** в сравнении с ибупрофеном были изучены противовоспалительные свойства на модели формалинового отека. Острую воспалительную реакцию (отек) воспроизводили субплантарным (под подошвенный апоневроз) введением 0,1 мл 2% раствора формалина. Выраженность воспалительной реакции оценивали через 3 ч после индукции воспаления по изменению объема лапы (онкометрически). Исследуемые вещества вводили зондом в желудок за 1 ч до формалина.

Эксперименты проведены на белых крысах, разделенных на 4 группы по 6 особей в каждой. Первая группа служила контролем, которой вводили субплантарно 2% раствор формалина. Остальным группам животных вводили исследуемые вещества. Вторая группа получала внутривентрикулярно ибупрофен в дозе 500 мг/кг, третья – пектин в дозе 3346 мг/кг, четвертая – 3846 мг/кг комплекса ибупрофена и пектина (**П/ИБП 6**), содержащего 13% ибупрофена. Результаты представлены в таблице 8.

4.5.2 Исследования биологической активности молекулярных комплексов пектина с ацетилсалициловой кислотой

Для комплексов пектина с ацетилсалициловой кислотой исследование осуществляли на половозрелых самцах крыс SpragueDawley в возрасте 7 месяцев массой 400 г. Животные по принципу аналогов были поделены на 7 групп по 6 крыс в каждой. Для моделирования воспалительной реакции, сопровождающейся отеком, крысам вводили 1%-й водный раствор каррагинана под плантарный апоневроз правой задней лапы. Через 30 минут однократно перорально вводили исследуемые препараты в виде

водных растворов: 1 группа – контроль (вода); 2 группа – АСК 10 мг/кг; 3 группа – АСК 20 мг/кг; 4 группа – АСК 40 мг/кг; 5 группа – П/АСК 100 мг/кг; 6 группа – П/АСК 5 200 мг/кг; 7 группа – П/АСК 5 400 мг/кг.

Для исследований использовали АСК марки ч.д.а. Дозы препаратов подобраны таким образом, чтобы животные, которым вводили комплекс, получали дозы, эквивалентные минимальной и оптимальным терапевтическим дозам АСК – 10, 20 и 40 мг/кг, которые были использованы в группах 2, 3 и 4.

Оценку воспалительной реакции и противовоспалительной активности исследуемых веществ проводили по выраженности отека и уровню болевой чувствительности. Выраженность отека измеряли по изменению объема лапы, выраженному в процентах по отношению к исходному объему, замеряемому на плетизмометре (UgoBasile) по объему вытесненной жидкости.

4.6 Исследования биологической активности комплексов полигалактуроната натрия с противомикробными препаратами

4.6.1 Исследования биологической активности молекулярных комплексов полигалактуроната натрия с тетрациклином

Для оценки влияния исследуемых препаратов изучено действие при внутрижелудочном введении, поскольку пероральный путь введения является терапевтическим способом применения препаратов и планируется в клинических исследованиях. Исследуемые комплексы и фармакологические субстанции животным вводили в смеси с твин-80 в объеме суспензии 2 см³, внутрижелудочно с применением гибкого зонда с последующим введением водной нагрузки.

Навески препарата взвешивали отдельно для каждого животного, рассчитывали индивидуально для каждого животного, основываясь на массе тела, зарегистрированной непосредственно перед введением вещества. Введение животным осуществляли натощак, для чего предварительно за 12 часов убрали кормушку с кормом. Доступ к корму возобновляли через час после введения.

Исследуемые препараты вводили однократно. Дозировки фармакологических субстанций составляли 1000 мг/кг массы тела (200 мг/животное массой тела 200 г). Дозировка комплексов рассчитывалась эквивалентно основному веществу.

Было сформировано четыре группы крыс по 15 особей в каждой (таблица 23).

Таблица 23 – Дизайн исследования

Номер группы	Вводимый препарат	Доза по основному веществу мг/кг массы тела	Количество крыс
Группа № 1	ТС	1000	15
Группа № 2	ПГNa/ТС 5	1000	15

Отбор проб крови с последующим отделением плазмы проводили через 1.0; 2.0; 4.0; 8.0 и 24.0 ч после введения препарата. На каждую точку отбора в соответствии с ТЗ было предусмотрено по три белой крысы. Отделенную плазму помещали в маркированные пробирки и до момента анализа все образцы хранили при минус 35°С.

Индикацию тетрациклина проводили по следующей методике. К 1 мл плазмы крови приливали 2,5 мл 0,01 н HCl и 2,5 г(NH₄)₂S₄O₄ до полного растворения соли. Гомогенат центрифугировали, декантировали, отбирали супернатант и обезжиривали последний экстракцией изооктаном 3 x 10 мл, при необходимости применяя для расслоения эмульсии центрифугирование. Водную фазу экстрагировали 3 x 20 мл бутанола. Объединенный экстракт упаривали досуха на ротационном испарителе, сухой остаток растворяли в 200 мкл метанола и использовали для анализа. На хроматографическую пластинку наносили аликвотный объем экстракта из пищевого продукта, различные количества стандартов тетрациклина, и хроматографировали в 10%-й щавелевой кислоте, насыщенной бутанолом. После прохождения фронтом элюента всей пластинки ее помещали в камеру с аммиаком, выдерживали 3 мин, сушили и рассматривали в УФ свете. Пятна тетрациклинов в пробе идентифицировали по желтой флуоресценции и R_f, соответствующих стандартам, оценивали их количества, сравнивая со стандартами. В качестве стандартов использовали точные концентрации субстанции тетрациклина. Чувствительность методики составила 1 мкг/мл. Результаты исследований представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Концентрация тетрациклина в плазме крови белых крыс на фоне однократного внутрижелудочного введения ТС и ПГNa/ТС 5 в дозе 1000 мг/кг массы тела ($M \pm m$, $n=3$)

Время исследования, ч	Группа животных / концентрация тетрациклина, мг/мл	
	1 (ТС)	2 (ПГNa/ТС 5)
1	40,8 ± 2,9	7,0 ± 0,5 *
2	56,9 ± 4,0	7,4 ± 0,5 *
4	42,5 ± 3,0	8,2 ± 0,6 *
8	12,9 ± 0,9	9,8 ± 0,7
24	2,1 ± 0,1	26,6 ± 1,9*

*Примечание:** – статистически значимые отличия от группы № 1

По результатам исследования построили усреднённые фармакокинетические кривые тетрациклина в плазме крови белых крыс после однократного перорального введения с вычислением следующих фармакокинетических параметров изучаемого действующего вещества: C_{\max} – максимальная концентрация (мкг/мл), T_{\max} – время достижения максимальной концентрации, $T_{1/2}$ – период полувыведения, время, за которое максимальная концентрация препарата в плазме (сыворотке) уменьшается вдвое, $AUC_{(0-t)}$ - площадь под фармакокинетической кривой и f - относительная биодоступность (степень всасывания).

Для полученных результатов приводили значения средних (M) и стандартных ошибок среднего арифметического ($\pm SEM$). Для оценки статистической значимости межгрупповых различий использовали тест Краскела–Уоллиса; критическим уровнем статистической значимости принимали $p = 0,05$.

4.6.2 Исследования биологической активности молекулярных комплексов полигалактуроната натрия с амоксициллином

Проведена оценка антимикробной активности (бактериостатической и бактерицидной) комплексов ПГNa с антибиотиком амоксициллином, относящемуся к группе β -лактамов. Для исследований было предоставлено три образца: ПГNa;

ПГNa/АХ 1; ПГNa/АХ 2 и образец субстанции, содержащей 80% амоксициллина. В ходе экспериментов предполагалось усилить антимикробные свойства за счет синергического действия компонентов, а также улучшить биодоступность амоксициллина путем введения ПГNa в исследуемый комплекс. Антимикробную активность предоставленных образцов изучали по отношению к тест-штаммам: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Escherichia coli* ATCC 25922, полученным из коллекции микроорганизмов III-IV групп патогенности. Типовые штаммы приобретены в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск».

Приготовление раствора амоксициллина

Стоковый раствор амоксициллина (250 мкг/мл) получали непосредственно в питательной среде для лучшей растворимости.

Приготовление раствора ПГNa

Готовили раствор ПГNa (5 мг/мл) в среде Мюллера-Хинтона. Затем пробирки помещали в термостат при 37°C и сутки выдерживали при постоянном перемешивании до получения гомогенной суспензии.

Определение антимикробной активности

Для определения МИК ПГNa и амоксициллина готовили серию двукратных разведений в 96-тилуночном планшете непосредственно в питательной среде. В каждую лунку вносили суспензию соответствующего тест-микроорганизма. Нагрузка микробной суспензии в опыте составляла 1×10^5 КОЕ/мл. МБК определяли путем пересева бактериологической петлей аликвоты из каждой лунки на поверхность питательной агаризованной среды Мюллера-Хинтона. Концентрации исследованных комплексов указаны в мкг/мл в пересчете на амоксициллин. Данные по антимикробной активности исследуемых образцов представлены в таблице 18.

Заключение

1. Установлено, что взаимодействие пектина с нестероидными противовоспалительными препаратами (ибупрофеном и ацетилсалициловой кислотой) протекает с образованием комплексов, в которых максимальное содержание ибупрофена и ацетилсалициловой кислоты достигает 15% и 16% соответственно.

2. Разработан метод синтеза комплексов пектина с противомикробными препаратами (тетрациклин и амоксициллин), базирующийся на взаимодействии пектата натрия с гидрохлоридом тетрациклина и гидрохлоридом амоксициллина соответственно. Установлено, что максимальное содержание противомикробных препаратов в комплексах с пектином составляет 6.7% для тетрациклина и 8.0% в случае амоксициллина.

3. Образование устойчивых комплексов пектина с нестероидными противовоспалительными и противомикробными препаратами доказано рядом физико-химических методов. В частности, методом порошковой рентгеновской дифракции установлено, что в комплексах имеет место гомогенное распределение лекарственных средств с отсутствием выделения последних в исходную кристаллическую фазу. Исследование термостабильности комплексов, проведенное методом термогравиметрии, показало, что все использованные в работе низкомолекулярные лекарственные средства имеют одну стадию потери массы, связанную с их разложением, в то время как пектин и комплексы на его основе имеют несколько стадий потери массы, обусловленных термическим разложением полимерного остова с выделением H_2O и CO_2 в качестве основных компонентов.

4. Проведено изучение противовоспалительной активности комплексов пектина с ибупрофеном и ацетилсалициловой кислотой на моделях *in vivo*. Установлено, что активность комплексов с ибупрофеном (модель «Формалиновый отек лапы у крыс») и ацетилсалициловой кислотой (модель «Горячая пластинка») выше, чем у исходных лекарственных препаратов. При этом ulcerогенное действие в группе крыс, получавших комплекс ибупрофена и пектина, проявилось в меньшей степени, чем у животных, получавших чистый ибупрофен.

5. Установлено, что минимальная ингибирующая концентрация комплексов пектина с тетрациклином на моделях *in vitro* сопоставима с активностью чистого

препарата тетрациклина в отношении всех тест-микроорганизмов (*E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*), в то время как минимальная бактериостатическая концентрация комплексов пектина с тетрациклином по отношению к *B. cereus* сопоставима с чистым тетрациклином, а по отношению к *S. aureus* в 2 раза выше.

6. Сравнение фармакокинетических параметров ибупрофена и комплексов пектина с ибупрофеном, а также тетрациклина и комплексов пектина с тетрациклином, проведенное на моделях *in vivo*, свидетельствует о пролонгированном характере высвобождения лекарственного препарата из комплекса в плазму крови лабораторных животных. Время достижения максимальной концентрации вещества в плазме крови составляет 4.0 ч и 8.0 ч для ибупрофена и комплекса пектина с ибупрофеном соответственно (при сравнимой биодоступности (100% и 89%)). Для комплекса пектина с тетрациклином время достижения максимальной концентрации вещества в плазме крови составило 24.0 ч по сравнению с 2.0 ч для тетрациклина при схожей биодоступности 85% и 100% соответственно.

7. Установлены параметры качества и проведена стандартизация фармацевтических субстанций комплексов пектина с ибупрофеном и тетрациклином, определяющие их эффективность и безопасность.

Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты являются фундаментальной основой для дальнейшей разработки перспективных противовоспалительных и противомикробных лекарственных средств на основе пектиновых полисахаридов. Разработанные методы синтеза комплексов цитрусового пектина с НПВС (ацетилсалициловая кислота и ибупрофен) и с противомикробными препаратами (тетрациклин и амоксициллин) с потенциальными практически полезными свойствами являются важными для развития современной фармацевтической химии.

Список сокращений

СЭ	Степень этерификации
RG-I	Рамногалактуронан-I
RG-II	Рамногалактуронан-II
ЦП	Цитрусовый пектин
МЦП	Модифицированный цитрусовый пектин
ГХ-МС	Газовая хроматография, совмещенная с масс-спектроскопией
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy, ИК-Фурье-спектроскопия
ЛПС	Липополисахарид
TNF- α	Фактор некроза опухоли альфа
IL-1 β	Интерлейкин-1 β
NO	Оксид азота (II)
DPFH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоукислота)
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛС	Лекарственное средство
ТС	Тетрациклин
АХ	Амоксициллин
НПВС	Нестероидные противовоспалительные средства
ЖКТ	Желудочно-кишечный тракт
П	Пектин
АСК	Ацетилсалициловая кислота
ИБП	Ибупрофен
П/АСК	Комплекс пектина с ацетилсалициловой кислотой
П/ИБП	Комплекс пектина с ибупрофеном
ПГ	Полигалактуронат
ПГNa	Полигалактуронат натрия
ПГNa/ТС	Комплекс полигалактуроната натрия с тетрациклином
ПГNa/АХ	Комплекс полигалактуроната натрия с амоксициллином

Список использованной литературы

-
- 1 Pectins and their Manipulation / G.B. Seymour, J.P. Knox (Eds.). – Oxford, Blackwell Publishing, 2002. – 262 p.
 - 2 . Минзанова, С.Т. Пектины из нетрадиционных источников: технология, структура, свойства и биологическая активность / С.Т. Минзанова, В.Ф. Миронов, А.И. Коновалов, А.Б. Выштакалюк, О.В. Цепяева, А.З. Миндубаев, В.В. Зобов. – Казань, изд-во «Печать-Сервис-XXI век», 2011. – 224 с.
 - 3 Minzanova, S.T. Biological Activity and Pharmacological Application of Pectic Polysaccharides: A Review / S.T. Minzanova, V.F. Mironov, D.M. Arkhipova, A.V. Khabibullina, L.G. Mironova, Y.M. Zakirova, V.A. Milyukov // Polymers. – 2018. – V. 10, № 12. – P.1407-1438. DOI 10.3390/polym10121407
 - 4 Liu, Q. Characterization of cationic modified debranched starch and formation of complex nanoparticles with κ -carrageenan and low methoxyl pectin / Q. Liu, M. Li, L. Xiong, L. Qiu, X. Bian, C. Sun, Q. Sun // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2019. – V. 67. – P. 2906–2915.
 - 5 Vaidya, A. Pectin–metronidazole prodrug bearing microspheres for colon targeting / A. Vaidya, S. Jain, R.K. Agrawal, S.K. Jain // Journal of Saudi Chemical Society. – 2015. – V. 19. – P. 257-264. DOI 10.1016/j.jscs.2012.03.001
 - 6 Nayak, A.K. Optimization of aceclofenac-loaded pectinate-poly(vinyl pyrrolidone) beads by response surface methodology / A.K. Nayak, S. Kalia, M.S. Hasnain // International Journal of Biological Macromolecules. – 2013. – V. 62. – P. 194-202. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2013.08.043
 - 7 Bindu, S. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective / S. Bindu, S. Mazumder, U. Bandyopadhyay // Biochemical Pharmacology. – 2020. – V. 180. – Article 114147. DOI 10.1016/j.bcp.2020.114147
 - 8 Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – Москва, 2007. – 1206 с.
 - 9 Горшкова, Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система / Т.А. Горшкова. – М.: Наука, 2007. – 429 с.

10 Li, D. Pectin in biomedical and drug delivery applications: A review / D. Li, J. Li, H. Dong, X. Li, J. Zhang, S. Ramaswamy, F. Xu // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – V. 185. – P. 49-65. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.088

11 Liu, J. Impacts of thermal and non-thermal processing on structure and functionality of pectin in fruit- and vegetable- based products: A review / J. Liu, J. Bi, D. J. McClements, X. Liu, J. Yi, J. Lyu, M. Zhou, R. Verkerk, M. Dekker, X. Wu, D. Liu // Carbohydrate Polymers. – 2020. – V. 250. – Article 116890. DOI 10.1016/j.carbpol.2020.116890

12 Slobodova, D.A. Combined Fractionation of Protopectin Degradation Products / D.A. Slobodova, R.M. Gorshkova, N.P. Novoselov, E.F. Panarin // Fibre Chem. – 2020. – V. 51. – P. 333-339. DOI 10.1007/s10692-020-10107-8

13 Пектин: основные свойства, производство и применение / Л.В. Донченко, Г.Г. Фирсов / – М.: ДеЛи принт, 2007. – 276 с.

14 Minzanova, S.T. Isolation and structural and chemical analysis of pectinic polysaccharides from *Amaranthus cruentus* / S.T. Minzanova, V.F. Mironov, O.V. Tsepaeva, L.G. Mironova, A.B. Vyshtakalyuk, A.Z. Mindubaev, I.R. Nizameev, K.V. Kholin, A.V. Pashagin // Chemistry of Natural Compounds. – 2014. – V. 50. – P. 54-59. DOI 10.1007/s10600-014-0865-4

15 Марков, П.А. Противовоспалительная активность пектинов и их галактуронанового кора / П.А. Марков, С.В. Попов, И.Р. Никитина, Р.Г. Оводова, Ю.С. Оводов // Химия растительного сырья. – 2010. – №1. – С. 21–26.

16 Valladares-Diestra, K.K. Citric acid assisted hydrothermal pretreatment for the extraction of pectin and xylooligosaccharides production from cocoa pod husks / K.K. Valladares-Diestra, L.P. de Souza Vandenberghe, L.A.Z. Torres, A.Z. Filho, A.L. Woiciechowski, C.R. Soccol // Bioresource Technology. – 2022. – V. 343. – Article 126074. DOI 10.1016/j.biortech.2021.126074

17 Cho, E.-H. Green process development for apple-peel pectin production by organic acid extraction / E.-H. Cho, H.-T. Jung, B.-H. Lee, H.-S. Kim, J.-K. Rhee, S.-H. Yoo // Carbohydrate Polymers. – 2019. – V. 204. – P. 97-103. DOI 10.1016/j.carbpol.2018.09.086

18 Romdhane, M.H. Optimization of extraction with salicylic acid, rheological behavior and antiproliferative activity of pectin from *Citrus sinensis* peels / M.H. Romdhane, A. Beltifa, Z. Mzoughi, C. Rihouey, H.B. Mansour, H. Majdoub, D. Le Cerf // International Journal of

Biological Macromolecules. – 2020. – V. 159. – P. 547-556.
DOI 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.125

19 Murayama D. Effect of surfactant-induced competitive displacement of whey protein conjugated to acid- or alkali-extracted potato pectin on emulsion stability / D. Murayama, S.A. Rankin, S. Ikeda // Food Hydrocolloids. – 2021. – V. 114. – Article 106558. DOI 10.1016/j.foodhyd.2020.106558

20 Cui, J. Alkali + cellulase-extracted citrus pectins exhibit compact conformation and good fermentation properties / J. Cui, C. Zhao, S. Zhao, G. Tian, F. Wang, C. Li, F. Wang, J. Zheng // Food Hydrocolloids. – 2020. – V. 108. – Article 106079. DOI 10.1016/j.foodhyd.2020.106079

21 Cui, J. The structure–property relationships of acid- and alkali-extracted grapefruit peel pectins / J. Cui, W. Ren, C. Zhao, W. Gao, G. Tian, Y. Bao, Y. Lian, J. Zheng // Carbohydrate Polymers. – 2020. – V. 229. – Article 115524. DOI 10.1016/j.carbpol.2019.115524

22 Marić, M. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction / M. Marić, A.N. Grassino, Z. Zhu, F.J. Barba, M. Brnčić, S.R. Brnčić // Trends in Food Science & Technology. – 2018. – V. 76. – P. 28-37. DOI 10.1016/j.tifs.2018.03.022

23 Milošević, M.M. Pectin from butternut squash (*Cucurbita moschata*) – The effect of enzyme-assisted extractions on fiber characteristics and properties / M.M. Milošević, M.G. Antov // Food Hydrocolloids. – 2022. – V. 123. – Article 107201. DOI 10.1016/j.foodhyd.2021.107201

24 Basak, S. The potential of subcritical water as a “green” method for the extraction and modification of pectin: A critical review / S. Basak, U.S. Annapure // Food Research International. – 2022. – V. 161. – Article 111849. DOI 10.1016/j.foodres.2022.111849

25 Muñoz-Almagro, N. Structural characterisation of pectin obtained from cacao pod husk. Comparison of conventional and subcritical water extraction / N. Muñoz-Almagro, L. Valadez-Carmona, J.A. Mendiola, E. Ibáñez, M. Villamiel // Carbohydrate Polymers. – 2019. – V. 217. – P. 69-78. DOI 10.1016/j.carbpol.2019.04.040

26 Liew, S.Q. Subcritical water extraction of low methoxyl pectin from pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peels / S.Q. Liew, W.H. Teoh, C.K. Tan, R. Yusoff, G.C. Ngoh // International Journal of Biological Macromolecules. – 2018. – V. 116. – P. 128-135. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.013

27 Hu, W. Enhanced extraction assisted by pressure and ultrasound for targeting RG-I enriched pectin from citrus peel wastes: A mechanistic study / W. Hu, H. Cheng, D. Wu, J. Chen, X. Ye, S. Chen // Food Hydrocolloids. – 2022. – V. 133. – Article 107778. DOI 10.1016/j.foodhyd.2022.107778

28 Tran, T.T.B. Comparison of ultrasound-assisted and conventional extraction for recovery of pectin from Gac (*Momordica cochinchinensis*) pulp / T.T.B. Tran, M. Saifullah, N.H. Nguyen, M.H. Nguyen, Q.V. Vuong // Future Foods. – 2021. – V. 4. – Article 100074. DOI 10.1016/j.fufo.2021.100074

29 Patience, N.A. Continuous and pulsed ultrasound pectin extraction from navel orange peels / N.A. Patience, D. Schieppati, D.C. Boffito // Ultrasonics Sonochemistry. – 2021. – V. 73. – Article 105480. DOI 10.1016/j.ultsonch.2021.105480

30 Dranca, F. Microwave vs. conventional extraction of pectin from *Malus domestica* 'Fälticeni' pomace and its potential use in hydrocolloid-based films / F. Dranca, E. Talón, M. Vargas, M. Oroian // Food Hydrocolloids. – 2021. – V. 121. – Article 107026. DOI 10.1016/j.foodhyd.2021.107026

31 Dao, T.A.T. Optimization of pectin extraction from fruit peels by response surface method: Conventional versus microwave-assisted heating / T.A.T. Dao, H.K. Webb, F. Malherbe // Food Hydrocolloids. – 2021. – V. 113. – Article 106475. DOI 10.1016/j.foodhyd.2020.106475

32 Gharibzahedi, S.M.T. Ultrasound-microwave assisted extraction of pectin from fig (*Ficus carica* L.) skin: Optimization, characterization and bioactivity / S.M.T. Gharibzahedi, B. Smith, Y. Guo // Ultrasonics-microwave assisted extraction of pectin from fig (*Ficus carica* L.) skin: Optimization, characterization and bioactivity. – Carbohydrate Polymers. – 2019. – V. 222. – Article 114992. DOI 10.1016/j.carbpol.2019.114992

33 Yang, J.-S. Optimization of ultrasound-microwave assisted acid extraction of pectin from potato pulp by response surface methodology and its characterization / J.-S. Yang,

T.-H. Mu, M.-M. Ma // *Food Chemistry*. – 2019. – V. 289. – P. 351-359.
DOI 10.1016/j.foodchem.2019.03.027

34 Minzanova, S.T. Complexation of pectin with macro- and microelements. Antianemic activity of Na, Fe and Na, Ca, Fe complexes / S.T. Minzanova, V.F. Mironov, A.B. Vyshakalyuk, O.V. Tsepaeva, L.G. Mironova, A.Z. Mindubaev, I.R. Nizameev, K.V. Kholin, V.A. Milyukov. // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – V. 134. – P. 524-533.
DOI 10.1016/j.carbpol.2015.07.034

35 Минзанова, С.Т. Синтез, свойства и антимикробная активность металлокомплексов пектина с кобальтом и никелем / С.Т. Минзанова, В.Ф. Миронов, Л.Г. Миронова, И.Р. Низамеев, К.В. Холин, А.Д. Волошина, Н.В. Кулик, Н.Г. Назаров, В. А. Милуков. // *Химия природных соединений*. – 2016. – № 1. – С. 28-32.
DOI 10.1007/s10600-016-1539-1

36 Khotimchenko, M.Y. Zinc-binding activity of different pectin compounds in aqueous solutions / M.Y. Khotimchenko, E.A. Kolenchenko, Y.S. Khotimchenko // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2008. – V. 323 (2). – P. 216-222. DOI 10.1016/j.jcis.2008.04.013

37 Cao, J. Modified citrus pectins by UV/H₂O₂ oxidation at acidic and basic conditions: Structures and in vitro anti-inflammatory, anti-proliferative activities / J. Cao, J. Yang, Z. Wang, M. Lu, K. Yue // *Carbohydrate Polymers*. – 2020. – V. 247. – Article 116742. DOI 10.1016/j.carbpol.2020.116742

38 Teng, H. Chemical structure, antioxidant and anti-inflammatory activities of two novel pectin polysaccharides from purple passion fruit (*Passiflora edulia* Sims) peel / H. Teng, Z. He, X. Li, W. Shen, J. Wang, D. Zhao, H. Sun, X. Xu, C. Li, X. Zha // *Journal of Molecular Structure*. – 2022. – V. 1264. – Article 133309. DOI 10.1016/j.molstruc.2022.133309

39 Xiong, B. Preparation, characterization, antioxidant and anti-inflammatory activities of acid-soluble pectin from okra (*Abelmoschus esculentus* L.) / B. Xiong, W. Zhang, Z. Wu, R. Liu, C. Yang, A. Hui, X. Huang, Z. Xian // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – V. 181. – P. 824-834. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.202

40 Wu, D. Enzyme-extracted raspberry pectin exhibits a high-branched structure and enhanced anti-inflammatory properties than hot acid-extracted pectin / D. Wu, S. Chen, X. Ye, X. Zheng, S. Ahmadi, W. Hu, C. Yu, H. Cheng, R. J. Linhardt, J. Chen // *Food Chemistry*. – 2022. – V. 383. – Article 132387. DOI 10.1016/j.foodchem.2022.132387

41 Zhang, T. Effects of enzymatic treatment on the physicochemical properties and antioxidant activity of hawthorn pectin / T. Zhang, H. Zhang, M. Wei, C. Zhu // *Materials Today Communications*. – 2022. – V. 30. – Article 103225. DOI 10.1016/j.mtcomm.2022.103225

42 Liu, N. Comparison of characterization and antioxidant activity of different citrus peel pectins / N. Liu, W. Yang, X. Li, P. Zhao, Y. Liu, L. Guo, L. Huang, W. Gao // *Food Chemistry*. – 2022. – V. 386. – Article 132683. DOI 10.1016/j.foodchem.2022.132683

43 Ho, G. T. T. Structure-activity relationship of immunomodulating pectins from elderberries / G. T. T. Ho, A. Ahmed, Y.F. Zou, T. Aslaksen, H. Wangensteen, H. Barsett // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – V. 125. – P. 241–248. DOI 10.1016/j.carbpol.2015.02.057

44 Kim, M.J. Effects of amidation and/or methylesterification of pectin on aroma release at different calcium concentration / M. J. Kim, H. K. Ju, Y. Kim, S.-H. Yoo, Y.-S. Kim // *Food Hydrocolloids*. – 2016. – V. 52. – P. 343-349. DOI 10.1016/j.foodhyd.2015.07.006

45 Amirian, J. In-situ crosslinked hydrogel based on amidated pectin/oxidized chitosan as potential wound dressing for skin repairing / J. Amirian, Y. Zeng, M. I. Shekh, G. Sharma, F. J. Stadler, J. Song, B. Du, Y. Zhu // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – V. 251. – Article 117005. DOI 10.1016/j.carbpol.2020.117005

46 Li, D. An injectable, self-healing hydrogel system from oxidized pectin/chitosan/ γ -Fe₂O₃ / D. Li, S. Wang, Y. Meng, J. Li, J. Li // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – V. 164. – P. 4566-4574. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.072

47 Ahadi, F. A hydrogel/fiber scaffold based on silk fibroin/oxidized pectin with sustainable release of vancomycin hydrochloride / F. Ahadi, S. Khorshidi, A. Karkhaneh // *European Polymer Journal*. – 2019. – V. 118. – P. 265-274. DOI 10.1016/j.eurpolymj.2019.06.001

48 Chetouani, A. Multifunctional hydrogels based on oxidized pectin and gelatin for wound healing improvement / A. Chetouani, M. Elkolli, H. Haffar, H. Chader, F. Riahi, T. Varacavoudin, D. Le Cerf // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – V. 212. – P. 248-256. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2022.05.082

49 Wan, L. Comparative study on gelling properties of low methoxyl pectin prepared by high hydrostatic pressure-assisted enzymatic, atmospheric enzymatic, and alkaline de-

esterification / L. Wan, H. Wang, Y. Zhu, S. Pan, R. Cai, F. Liu, S. Pan // *Carbohydrate Polymers*. – 2019. – V. 226. – Article 115285. DOI 10.1016/j.carbpol.2019.115285

50 Wan, L. Physiochemical, rheological and emulsifying properties of low methoxyl pectin prepared by high hydrostatic pressure-assisted enzymatic, conventional enzymatic, and alkaline de-esterification: A comparison study / L. Wan, Q. Chen, M. Huang, F. Liu, S. Pan // *Food Hydrocolloids*. – 2019. – V. 93. – P. 146-155. DOI 10.1016/j.foodhyd.2019.02.022

51 Cai, R. Curcumin loading and colon release of pectin gel beads: Effect of different de-esterification method / R. Cai, S. Pan, R. Li, X. Xu, S. Pan, F. Liu // *Food Chemistry*. – 2022. – V. 389. – Article 133130. DOI 10.1016/j.foodchem.2022.133130

52 Talekar, S. Greener production of low methoxyl pectin via recyclable enzymatic de-esterification using pectin methylesterase cross-linked enzyme aggregates captured from citrus peels / S. Talekar, R. Vijayraghavan, A. Arora, A. F. Patti // *Food Hydrocolloids*. – 2020. – V. 108. – Article 105786. DOI 10.1016/j.foodhyd.2020.105786

53 Işıklan, N. Development of thermo/pH-responsive chitosan coated pectin-graft-poly(N,N-diethyl acrylamide) microcarriers / N. Işıklan, Ş. Tokmak // *Carbohydrate Polymers*. – 2019. – V. 218. – P. 112-125. DOI 10.1016/j.carbpol.2019.04.068

54 Işıklan, N. Synthesis and characterization of thermo/pH-sensitive pectin-graft-poly(dimethylaminoethyl methacrylate) coated magnetic nanoparticles / N. Işıklan, S. Polat // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – V. 164. – P. 4499-4515. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.002

55 Huang, B. Investigation of the pectin grafting with gallic acid and propyl gallate and their antioxidant activities, antibacterial activities and fresh keeping performance / B. Huang, Z. Zhang, N. Ding, B. Wang, G. Zhang, P. Fei // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – V. 190. – P. 343-350. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.219

56 Lascol, M. Development of pectin microparticles by using ionotropic gelation with chlorhexidine as cross-linking agent / M. Lascol, S. Bourgeois, C. Barratier, P. Marote, P. Lantéri, C. Bordes // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2018. – V. 542. – P. 205-212. DOI 10.1016/j.ijpharm.2018.03.011

57 Das, S. Quality-by-design approach for development of sustained-release multiple-unit beads of lamotrigine based on ion-cross-linked composite of pectin and okra mucilage: An in vitro appraisal / S. Das, A. Ghosh, A. Changder, G. Nandi, L. K. Ghosh // *International*

Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – V. 163. – P. 842-853.
DOI 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.033

58 Oh, G.-W. Characterization of ionic cross-linked composite foams with different blend ratios of alginate/pectin on the synergistic effects for wound dressing application / G.-W. Oh, S. Y. Nam, S.-J. Heo, D.-H. Kang, W.-K. Jung // International Journal of Biological Macromolecules. - 2020. – V. 156. – P. 1565-1573. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.206

59 Wang, S. Chemical cross-linking approach for prolonging diclofenac sodium release from pectin-based delivery system / S. Wang, J. Li, Y. Zhou, D. Li, G. Du // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – V. 137. – P. 512-520. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.011

60 Norcino, L.B. Rheological and thermo-mechanical evaluation of bio-based chitosan/pectin blends with tunable ionic cross-linking / L.B. Norcino, J.E. de Oliveira, F.K.V. Moreira, J.M. Marconcini, L.H.C. Mattoso // International Journal of Biological Macromolecules. – 2018. – V. 118. – P. 1817-1823. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.027

61 Shitrit, Y. Shear thinning pectin hydrogels physically cross-linked with chitosan nanogels / Y. Shitrit, M. Davidovich-Pinhas, H. Bianco-Peled // Carbohydrate Polymers. – 2019. – V. 225. – Article 115249. DOI 10.1016/j.carbpol.2019.115249

62 Ajaz, N. Pectin-based hydrogels with adjustable properties for controlled delivery of nifedipine: development and optimization / N. Ajaz, I. Khalid, M.U. Minhas, K. Barkat, I.U. Khan, H.K. Syed, S. Asghar, R. Munir, F. Aslam // Polymer Bulletin. – 2020. – V. 77. – P. 6063-6083.

63 Garrido, C.A. Auto-cross-linking hydrogels of hydrogen peroxide-oxidized pectin and gelatin for applications in controlled drug delivery / C.A. Garrido, M. Vargas, J.F. Alvarez-Barreto // International Journal of Polymer Science. – 2019. – Article 9423565.

64 Ullah, K. Pectin-based (LA-co-MAA) semi-IPNS as a potential biomaterial for colonic delivery of oxaliplatin / K. Ullah, M. Sohail, M.A. Buabeid, G. Murtaza, A. Ullah, H. Rashid, M.A. Khan, S.A. Khan // International Journal of Pharmaceutics. – 2019. – V. 569. – Article 118557. DOI 10.1016/j.ijpharm.2019.118557

65 Long, J. A 3D printed chitosan-pectin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery / J. Long, A.E. Etxeberria, A.V. Nand, C.R. Bunt, S. Ray, A. Seyfoddin

// Materials Science and Engineering: C. – 2019. – V. 104. – Article 109873.
DOI 10.1016/j.msec.2019.109873

66 Moghaddam, R.H. Electron beam irradiation synthesis of porous and non-porous pectin based hydrogels for a tetracycline drug delivery system / R.H. Moghaddam, S. Dadfarnia, A.M.H. Shabani, Z.H. Moghaddam, M. Tavakol // Materials Science and Engineering: C. – 2019. – V. 102. – P. 391-404. DOI 10.1016/j.msec.2019.04.071

67 Yu, N. Development of antibacterial pectin from *Akebia trifoliata* var. *australis* waste for accelerated wound healing / N. Yu, X. Wang, F. Ning, C. Jiang, Y. Li, H. Peng, H. Xiong // Carbohydrate Polymers. – 2019. – V. 217. – P. 58-68. DOI 10.1016/j.carbpol.2019.03.071

68 Pettinelli, N. Entrapment of chitosan, pectin or κ -carrageenan within methacrylate based hydrogels: Effect on swelling and mechanical properties / N. Pettinelli, S. Rodríguez-Llamazares, V. Abella, L. Barral, R. Bouza, Y. Farrag, F. Lago // Materials Science and Engineering: C. – 2019. – V. 96. – P. 583-590. DOI 10.1016/j.msec.2018.11.071

69 Prezotti, F.G. Mucoadhesive films based on gellan gum/pectin blends as potential platform for buccal drug delivery / F.G. Prezotti, I. Siedle, F.I. Boni, M. Chorilli, I. Müller, B.F. Cury // Pharmaceutical Development and Technology. – 2020. – V. 25 (2). – P. 159-167. DOI 10.1080/10837450.2019.1682608

70 Kodoth, A.K. Pectin-based silver nanocomposite film for transdermal delivery of Donepezil / A.K. Kodoth, V.M. Ghate, S.A. Lewis, B. Prakash, V. Badalamoole // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – V. 134. – P. 269-279. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.191

71 Pan, J. Preparation, characterization and in vitro release properties of pectin-based curcumin film / J. Pan, D. Cao, X. Ma, J. Yang // Korean Journal of Chemical Engineering – 2019. – V. 36 (5). – P. 822-827. DOI 10.1007/s11814-019-0238-6

72 Alavi, T. Pluronic-F127 composite film loaded with erythromycin for wound application: formulation, physicomechanical and in vitro evaluations / T. Alavi, M. Rezvanian, N. Ahmad, N. Mohamad, & S. Ng // Drug Delivery and Translational Research – 2019. – V. 9. – P. 508-519. DOI 10.1007/s13346-017-0450-z

73 Rebitski, E.P. Chitosan and pectin core-shell beads encapsulating metformin-clay intercalation compounds for controlled delivery / E.P. Rebitski, M. Darder, R. Carraro,

P. Aranda, E.R.-Hitzky // *New Journal of Chemistry*. – 2020. – V. 44. – P. 10102-10110. DOI 10.1039/c9nj06433h

74 Nižić, L. Development, characterisation and nasal deposition of melatonin-loaded pectin/hypromellose microspheres / L. Nižić, J. Potaš, K. Winnicka, M. Szekalska, I. Erak, M. Gretić, M. Jug, A. Hafner // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2020. – V. 141. – Article 105115. DOI 10.1016/j.ejps.2019.105115

75 Zhu, J. Preparation and characterization of pectin/chitosan beads containing porous starch embedded with doxorubicin hydrochloride: A novel and simple colon targeted drug delivery system / J. Zhu, L. Zhong, W. Chen, Y. Song, Z. Qian, X. Cao, Q. Huang, B. Zhang, H. Chen, W. Chen // *Food Hydrocolloids*. – 2019. – V. 95. – P. 562-570. DOI 10.1016/j.foodhyd.2018.04.042

76 Khodashenas, B. Conjugation of pectin biopolymer with Au-nanoparticles as a drug delivery system: Experimental and DFT studies / B. Khodashenas, M. Ardjmand, M.S. Baei, A.S. Rad, A. Akbarzadeh // *Applied Organometallic Chemistry*. – 2020. – V. 34. – P. 5609.

77 Bera, H. Core-shell structured pullulan based nanocomposites as erlotinib delivery shuttles / H. Bera, S. R. Ang, S. W. Chiong, C. H. Chan, Y. F. Abbasi, L. P. Law, B. Chatterjee, V. Venugopal // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. – 2019. – V. 69. – P. 848-859. DOI 10.1080/00914037.2019.1626389

78 Cheikh, D. Complex of chitosan pectin and clay as diclofenac carrier / D. Cheikh, F. García-Villén, H. Majdoub, M. B. Zayani, C. Viseras // *Applied Clay Science*. – 2019. – V. 172. – P. 155-164. DOI 10.1016/j.clay.2019.03.004

79 Mundlia, J. Pectin–curcumin composite: synthesis, molecular modeling and cytotoxicity / J. Mundlia, M. Ahuja, P. Kumar, V. Pillay // *Polymer Bulletin*. – 2019. – V. 76. – P. 3153–3173 DOI 10.1007/s00289-018-2538-0

80 Malshetty, R. Design and in vitro evaluation of antiamebic tablets on colon drug delivery system / R. Malshetty, Md. M. Iqbal, N. Fatima, T. Tadmale, R. Saraswat // *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2019. – V. 10(8). – P. 3920-3927.

81 Cazorla-Luna, R. Dapivirine bioadhesive vaginal tablets based on natural polymers for the prevention of sexual transmission of HIV / R. Cazorla-Luna, A. Martín-Illana,

F. Notario-Pérez, L.-M. Bedoya, P. Bermejo, R. Ruiz-Caro, M.-D. Veiga // *Polymers*. – 2019. – V. 11. – P. 483. DOI 10.3390/polym11030483

82 Zhu, W. Enzyme-responsive mechanism based on multi-walled carbon nanotubes and pectin complex tablets for oral colon-specific drug delivery system / W. Zhu, C. Han, Y. Dong, B. Jian // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. – 2019. – V. 320. – P. 503-512. DOI 10.1007/s10967-019-06501-0

83 Fan, C. Pectin-conjugated silica microcapsules as dual-responsive carriers for increasing the stability and antimicrobial efficacy of kasugamycin / C. Fan, M. Guo, Y. Liang, H. Dong, G. Ding, W. Zhang, G. Tang, J. Yang, D. Kong, Y. Cao // *Carbohydrate Polymers*. – 2017. – V. 172. – P.322-331. DOI 10.1016/j.carbpol.2017.05.050

84 Cheewatanakornkool, K. Thiolated pectin-doxorubicin conjugates: Synthesis, characterization and anticancer activity studies / K. Cheewatanakornkool, S. Niratisai, S. Manchun, C. R. Dass, P. Sriamornsak // *Carbohydrate Polymers*. – 2017. – V. 174. – P. 493-506. DOI 10.1016/j.carbpol.2017.06.115

85 Cheewatanakornkool, K. Characterization and in vitro release studies of oral microbeads containing thiolated pectin–doxorubicin conjugates for colorectal cancer treatment / K. Cheewatanakornkool, S. Niratisai, S. Manchun, C. Dass, P. Sriamornsak // *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – V. 12 – P. 509-520.

86 Varshosaz, J. Synthesis of pectin-deoxycholic acid conjugate for targeted delivery of anticancer drugs in hepatocellular carcinoma / J. Varshosaz, F. Sadri, M. Rostami, M. Mirian, S. Taymouri // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. – V. 139. – P. 665-677.

87 Shishir, M. Pectin-chitosan conjugated nanoliposome as a promising delivery system for neohesperidin: Characterization, release behavior, cellular uptake, and antioxidant property / M. Shishir, N. Karim, V. Gowd, J. Xie, X. Zheng, W. Chen // *Food Hydrocolloids*. 2019. – V. 95. – P. 432-444.

88 Liu, Y. A novel self-assembled nanoparticle platform based on pectin-eight-arm polyethylene glycol-drug conjugates for co-delivery of anticancer drugs / Y. Liu, K. Liu, X. Li, S. Xiao, D. Zheng, P. Zhu, C. Li, J. Liu, J. He, J. Lei, L. Wang // *Materials Science and Engineering: C*. – 2018. – V. 86. – P. 28-41. DOI 10.1016/j.msec.2017.12.018

89 Kothandaraman, G. Anti-fungal and anti-leishmanial activities of pectin-amphotericin B conjugates / G. Kothandaraman, V. Ravichandran, C. Bories, P. Loiseau, A. Jayakrishnan // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2017. – V. 39. – P. 1-7. DOI 10.1016/j.jddst.2017.02.010

90 Zhu, J. Preparation and characterization of pectin/chitosan beads containing porous starch embedded with doxorubicin hydrochloride: A novel and simple colon targeted drug delivery system / J. Zhu, L. Zhong, W. Chen, Y. Song, Z. Qian, X. Cao, Q. Huang, B. Zhang, H. Chen, W. Chen // *Food Hydrocolloids*. – 2019. – V. 95. – P. 562-570. DOI 10.1016/j.foodhyd.2018.04.042

91 Mishra, M. Pectin, beta-cyclodextrin, chitosan and albumin based gastroprotective systems for piroxicam maleate: Synthesis, characterization and biological evaluation / M. Mishra, V. Chawla, P. Chawla // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – V. 122. – P. 127-136. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.069

92 Wang, T. Targeted polymer-based antibiotic delivery system: A promising option for treating bacterial infections via macromolecular approaches / T. Wang, F. Rong, Y. Tang, M. Li, T. Feng, Q. Zhou, P. Li, W. Huang // *Progress in Polymer Science*. – 2021. – V. 116. – Article 101389. DOI 10.1016/j.progpolymsci.2021.101389

93 Duarte-Peña, L. Modification of indwelling PVC catheters by ionizing radiation with temperature- and pH-responsive polymers for antibiotic delivery / L. Duarte-Peña, F. López-Saucedo, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, E. Bucio // *Radiation Physics and Chemistry*. – 2022. – V. 193. – Article 110005. DOI 10.1016/j.radphyschem.2022.110005

94 Ren, H.-M. Inhalable responsive polysaccharide-based antibiotic delivery nanoparticles to overcome mucus barrier for lung infection treatment / H.-M. Ren, L. Han, L. Zhang, Y.-Q. Zhao, C. Lei, Z. Xiu, N. Zhao, B. Yu, F. Zhou, S. Duan, F.-J. Xu // *Nano Today*. – 2022. – V. 44. – Article 101489. DOI 10.1016/j.nantod.2022.101489

95 Taghizadeh, M.T. Cross-linked chitosan in nano and bead scales as drug carriers for betamethasone and tetracycline / M.T. Taghizadeh, H. Ashassi-Sorkhabi, R. Afkari, A. Kazempour // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – V. 131. – P. 581-588. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.094

96 Assadi, Z. Novel synergistic activities of tetracycline copper oxide nanoparticles integrated into chitosan micro particles for delivery against multiple drug resistant strains:

Generation of reactive oxygen species (ROS) and cell death / Z. Assadi, G. Emtiazi, A. Zarrabi // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2018. – V. 44. – P. 65-70. DOI 10.1016/j.jddst.2017.11.017

97 Parsa, P. Investigating the effect of tetracycline addition on nanocomposite hydrogels based on polyvinyl alcohol and chitosan nanoparticles for specific medical applications / P. Parsa, A. Paydayesh, S.M. Davachi // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – V. 121. – P. 1061-1069. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.074

98 Ghazalian, M. Fabrication and characterization of chitosan-polycaprolactone core-shell nanofibers containing tetracycline hydrochloride / M. Ghazalian, S. Afshar, A. Rostami, S. Rashedi, S.H. Bahrami // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2022. – V. 636. – Article 128163. DOI 10.1016/j.colsurfa.2021.128163

99 Javanbakht, S. Carboxymethyl cellulose/tetracycline@UiO-66 nanocomposite hydrogel films as a potential antibacterial wound dressing / S. Javanbakht, M. Nabi, M. Shadi, M.M. Amini, A. Shaabani // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – V. 188. – P. 811-819. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.061

100 Darvishi, S. Ultrasound-assisted synthesis of MIL-88(Fe) coordinated to carboxymethyl cellulose fibers: A safe carrier for highly sustained release of tetracycline / S. Darvishi, S. Javanbakht, A. Heydari, F. Kazeminava, P. Gholizadeh, M. Mahdipour, A. Shaabani // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – V. 181. – P. 937-944. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.092

101 Bundjaja, V. Aqueous sorption of tetracycline using rarasaponin-modified nanocrystalline cellulose / V. Bundjaja, T.M. Sari, F.E. Soetaredjo, M. Yuliana, A.E. Angkawijaya, S. Ismadji, K.-C. Cheng, S.P. Santoso // *Journal of Molecular Liquids*. – 2020. – V. 301. – Article 112433. DOI 10.1016/j.molliq.2019.112433

102 Song, F. A robust regenerated cellulose-based dual stimuli-responsive hydrogel as an intelligent switch for controlled drug delivery / F. Song, J. Gong, Y. Tao, Y. Cheng, J. Lu, H. Wang // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – V. 176. – P. 448-458. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.104

103 Verza, B.S. A long-term controlled drug-delivery with anionic beta cyclodextrin complex in layer-by-layer coating for percutaneous implants devices / B.S. Verza, J.J.J.P. van den Beucken, J.V. Brandt, M. Jafelicci Jr, V.A.R. Barão, R.D. Piazza, O. Tagit,

D.M.P. Spolidorio, C.E. Vergani, E.D. de Avila // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – V. 257. – Article 117604. DOI 10.1016/j.carbpol.2020.117604

104 Mullassery, M.D. Microwave- assisted green synthesis of acrylamide cyclodextrin-grafted silylated bentonite for the controlled delivery of tetracycline hydrochloride / M.D. Mullassery, N.B. Fernandez, S. R, D. Thomas // *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. – 2018. – V. 10. – P. 103-111. DOI 10.1016/j.scp.2018.10.006

105 Ari, B. Superporous poly(β -Cyclodextrin) cryogels as promising materials for simultaneous delivery of both hydrophilic and hydrophobic drugs / B. Ari, S. Demirci, R.S. Ayyala, B. Salih, N. Sahiner // *European Polymer Journal*. – 2022. – V. 176. – Article 111399. DOI /10.1016/j.eurpolymj.2022.111399

106 Hsiung, E. Antibacterial nanofibers of pullulan/tetracycline-cyclodextrin inclusion complexes for Fast-Disintegrating oral drug delivery / E. Hsiung, A. Celebioglu, R. Chowdhury, M.E. Kilic, E. Durgun, C. Altier, T. Uyar // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2022. – V. 610. – P. 321-333. DOI 10.1016/j.jcis.2021.12.013

107 Jeong, D. Carboxymethyl cellulose-based superabsorbent hydrogels containing carboxymehtyl β -cyclodextrin for enhanced mechanical strength and effective drug delivery / D. Jeong, S.-W. Joo, Y. Hu, V.V. Shinde, E. Cho, S. Jung // *European Polymer Journal*. – 2018. – V. 105. P. 17-25. DOI 10.1016/j.eurpolymj.2018.05.023

108 Минзанова, С.Т. Получение, состав и физико-химические свойства комплексов пектина с ибупрофеном / С.Т. Минзанова, Е.В. Чекунков, В.А. Милюков, Л.Г. Миронова, А.В. Хабибуллина, Д.М. Архипова, А.И. Самигуллина, А.Т. Губайдуллин, В.Ф. Миронов // *Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах*. – 2020. – Т. 491. – С. 49-54.

109 Chekunkov, Y.V. New complexes of pectic polysaccharides with nonsteroidal anti-inflammatory drugs / Y.V. Chekunkov, S.T. Minzanova, A.V. Khabibullina, D.M. Arkhipova, L.G. Mironova, A.V. Nemtarev, A.R. Khamatgalimov, A.T. Gubaidullin, V.A. Milyukov // *Russian Chemical Bulletin, International Edition*. – 2020. – V. 69 (3). – P. 572-580. DOI 10.1007/s11172-020-2801-z

110 Vyshtakaliuk, A.B. Anti- inflammatory effect of the molecular pectin complex with acetylsalicylic acid on a model of carrageenan paw edema in rats / A.B. Vyshtakaliuk, K.N. Bushmeleva, O.A. Lenina, L.F. Gumarova, S.T. Minzanova, A.A. Parfenov,

G.P. Belyaev, L.G. Mironova, E.V. Chekunkov, V.V. Zobov // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2020. – V. 11(4). – P. 1581-1591.

111 Chekunkov, Y.V. Complexes based on citrus pectin for delivery of tetracycline / Y.V. Chekunkov, S.T. Minzanova, A.V. Khabibullina, D.M. Arkhipova, L.G. Mironova, A.V. Nemtarev, A.R. Khamatgalimov, A.T. Gubaidullin, V.A. Milyukov // Russian Chemical Bulletin, International Edition. – 2022. – V. 71 (3). – P. 549-556. DOI 10.1007/s11172-022-3447-9

112 Выштакалюк, А.Б. Синтез и первичная оценка биологических свойств молекулярного комплекса пектина с Диклофенаком / А.Б. Выштакалюк, С.Т. Минзанова, Е. В. Чекунков, О.А. Ленина, Л.Ф. Гумарова, Г.П. Беляев, Д.Ф. Абрамова, А.А. Парфенов, Л.Р. Хасаншина, К.Н. Бушмелева, Л.Г. Миронова, В.В. Зобов // Вестник Технологического университета. – 2020. – Т. 23 (11). – С. 28-33.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Проект фармацевтической статьи на комплекс пектина с ибупрофеном П/ИБП 6

ПРОЕКТ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Номер реестровой записи _____

Дата включения в государственный реестр лекарственных средств

« ____ » _____ 20__ г.

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

Комплекс пектина с ибупрофеном П/ИБП 6

СУБСТАНЦИЯ-ПОРОШОК

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ УПАКОВКА)

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

СПЕЦИФИКАЦИЯ

Комплекс пектина с ибупрофеном П/ИБП 6, субстанция-порошок

В соответствии с ОФС.1.1.0006 «Фармацевтические субстанции», ГФ XV.

№	Наименование показателя	Норма	Методы испытания
1	Описание	Аморфный порошок бежевого цвета	Органолептический
2	Растворимость	Умеренно медленно (не менее 1 часа при температуре 50 °С и перемешивании на магнитной мешалке) растворим в воде с образованием опалесцирующего раствора	ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость», ГФ XV
3	Подлинность	ИК-спектр субстанции должен быть идентичен приложенному спектру (рисунок 41) УФ-спектр субстанции должен быть идентичен приложенному спектру (рисунок 42) Угол удельного оптического вращения 0.5%-о водного раствора при длине кюветы 62 мм должен быть не менее 150, не более $180 (^{\circ}) \cdot \text{мл} \cdot \text{дм}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$	ОФС.1.2.1.1.0002 «Спектрометрия в средней инфракрасной области», ГФ XV ОФС.1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях», ГФ XV ОФС.1.2.1.0018 «Оптическое вращение», ГФ XV
4	Прозрачность раствора	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды должен выдерживать сравнение с эталоном III или IV	ОФС.1.2.1.0007 «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей», ГФ XV

	1	2	3
5	Цветность раствора	Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен иметь белесую опалесценцию	ОФС.1.2.1.0006 «Степень окраски жидкостей», ГФ XV
6	pH раствора	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды должен иметь pH не менее 3.0, не более 4.5	ОФС.1.2.1.0004 «Ионометрия», ГФ XV, метод 3
7	Родственные примеси	На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика примеси F не должна превышать площадь пика примеси F на хроматограмме раствора сравнения (не более 0.1 %).	ОФС.1.2.1.2.0005 «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ГФ XV
8	Хлориды	Не более 0.1%	ОФС.1.2.2.2.0009 «Хлориды», ГФ XV
9	Потеря в массе при высушивании	Не менее 6.0%, не более 12.0%	ОФС.1.2.1.0010 «Потеря в массе при высушивании», ГФ XV, способ 1
10	Общая зола	Не более 10.0% в пересчете на сухое вещество	ОФС.1.2.2.2.0013 «Зола общая», ГФ XV
11	Сульфатная зола	Не более 3.3% в пересчете на сухое вещество	ОФС.1.2.2.2.0014 «Сульфатная зола», ГФ XV
12	Тяжелые металлы	Не более 0.001%	ОФС.1.2.2.2.0012 «Тяжелые металлы», ГФ XV, метод 1.

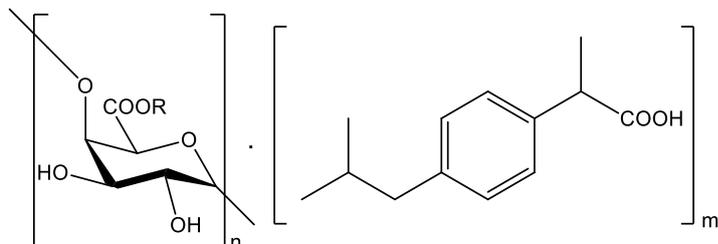
	1	2	3
13	Остаточные органические растворители	Содержание этилового спирта не более 0.5% в субстанции в пересчете на сухое вещество	ОФС.1.2.1.2.0004 «Газовая хроматография», ГФ XV
14	Микробиологическая чистота	Категория 3А	ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота», ГФ XIV, ч. 1, с. 1129
15	Количественное определение	Содержание ибупрофена в фармсубстанции не менее 13.5% и не более 16.5%	ОФС.2.1.0100 «Ибупрофен», ГФ XV; (ОФС. 1.2.3.0029 «Титриметрия (титриметрические методы анализа)», ГФ XV

Комплекс пектина с ибупрофеном П/ИБП 6

Полное химическое название:

Молекулярный комплекс цитрусового пектина с ибупрофеном П/ИБП 6

Структурная формула:



Эмпирическая формула:

$[C_6H_7O_6R]_n[Ibu]_m$, R = H, CH₃; где n = 98; m = 15

Молекулярная масса: 40.31 кДа

Молекулярная масса субстанции зависит от молекулярно-массового распределения в исходном пектине, которая определяется методом вискозиметрии по характеристической вязкости.

Описание. Аморфный порошок от светло-бежевого до бежевого цвета.

Растворимость. К 1 г субстанции добавляют несколько капель спирта во избежание комкования и прилипания препарата к стенкам сосуда, затем добавляют точно 100 мл воды, перемешивают при 50°C на магнитной мешалке в течение 1 часа. Образуется опалесцирующий раствор.

Подлинность.

Спектрометрия в средней инфракрасной области.

Тщательно растирают 1–2 мг испытуемого вещества с 0.3–0.4 г измельченного и высушенного калия бромидом, добиваясь необходимой однородности, и прессуют диск при давлении около 800 МПа (8 т/см²). Инфракрасный спектр субстанции, снятый в области от 4000 до 400 см⁻¹, по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку 41 спектра комплекса пектина с ибупрофеном (ОФС.1.2.1.1.0002 «Спектрометрия в средней инфракрасной области», ГФ XV).

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях.

В стакан вместимостью 100 мл помещают 50 мл воды, добавляют 0.5 г субстанции (точная навеска) и перемешивают при 50°C на магнитной мешалке в течение 1 часа.

Затем содержимое стакана количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, используя воронку с длинным носиком. Стакан ополаскивают 10 мл воды и переливают в мерную колбу, операцию повторяют еще 2 раза. Содержимое мерной колбы охлаждают до комнатной температуры и доводят водой до метки. Снимают спектр в ультрафиолетовой и видимой области (200 – 400 нм), который должен соответствовать рисунку 42 спектра комплекса пектина с ибупрофеном (ОФС.1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях», ГФ XV).

Измерение удельного оптического вращения.

В стакан вместимостью 100 мл помещают 50 мл воды, добавляют 0.5 г субстанции (точная навеска) и перемешивают при 50°C на магнитной мешалке в течение 1 часа. Затем содержимое стакана количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, используя воронку с длинным носиком. Стакан ополаскивают 10 мл воды и переливают в мерную колбу, операцию повторяют еще 2 раза. Содержимое мерной колбы охлаждают до комнатной температуры и доводят водой до метки. Определяют удельный угол вращения плоскости поляризации раствора с точной концентрацией (в пересчёте на сухое вещество) при длине волны 589 нм (длина кюветы 62 мм). Рассчитанный по формуле угол удельного оптического вращения должен быть не менее +150 (°)·мл·дм⁻¹·г⁻¹ и не более +180 (°)·мл·дм⁻¹·г⁻¹ (ОФС.1.2.1.0018 «Оптическое вращение», ГФ XV).

Прозрачность раствора. К 0,5 г субстанции прибавляют несколько капель спирта во избежание комкования и прилипания препарата к стенкам сосуда, затем добавляют 100 мл воды, перемешивают при 50°C на магнитной мешалке в течение 1 ч 10 мл полученного раствора должны выдерживать сравнение с эталоном III (ОФС.1.2.1.0007 «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей», ГФ XV).

Цветность раствора. Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен иметь белесую опалесценцию (ОФС.1.2.1.0006 «Степень окраски жидкостей», ГФ XV).

pH раствора. К 0.5 г субстанции прибавляют несколько капель спирта во избежание комкования и прилипания препарата к стенкам сосуда, затем добавляют 100 мл воды, перемешивают при 50°C на магнитной мешалке в течение 1 ч, затем охлаждают и

проводят измерения в диапазоне от 20 до 25°C. рН полученного раствора должна быть не менее 3.0, не более 4.5 (ОФС.1.2.1.0004 «Ионометрия», ГФ XV, метод 3).

Родственные примеси. Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Подвижная фаза А (ПФА). В химический стакан вместимостью 1000 мл помещают 0.5 мл фосфорной кислоты концентрированной, 340 мл ацетонитрила и 600 мл воды и доводят объём раствора водой до 1000 мл.

Подвижная фаза Б (ПФБ). Ацетонитрил.

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 20 мг субстанции, растворяют в 2.0 мл ацетонитрила и доводят объём раствора ПФА до метки.

Раствор сравнения. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1.0 мл испытуемого раствора, доводят объём раствора ПФА до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1.0 мл полученного раствора, доводят объём раствора ПФА до метки и перемешивают.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1.0 мл 0.06%-го раствора стандартного образца, содержащего примесь В (2RS)-2-(4-бутилфенил) пропановая кислота [3585-49-7] в ацетонитриле, доводят объём раствора ПФА до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1.0 мл полученного раствора, прибавляют 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора ПФА до метки и перемешивают.

Хроматографические условия

Колонка	150 × 4,6 мм, силикагель октадецил-силильный для хроматографии, 5 мкм
Температура колонки	25 °С
Скорость потока	2.0 мл/мин
Детектор	спектрофотометрический, 214 нм
Объём пробы	20 мкл

Режим хроматографирования

Время, мин	ПФА, %	ПФБ, %
0–25	100	0
25–55	100 → 15	0 → 85
55–70	15	85

Уравновешивают колонку ПФА в течение не менее 45 мин. Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы, раствор сравнения и испытуемый раствор.

Относительное время удерживания соединений. Ибупрофен – 1 (около 16 мин); примесь В – около 1,1.

Пригодность хроматографической системы. На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы разрешение (RS) между пиками примеси В и ибупрофена должно быть не менее 1.5.

Допустимое содержание примесей. На хроматограмме испытуемого раствора:

- площадь пика любой другой примеси не должна более чем в 1.5 раза превышать площадь пика ибупрофена на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,15 %);
- сумма площадей пиков всех примесей не должна более чем в 2 раза превышать площадь пика ибупрофена на хроматограмме раствора сравнения (не более 0.2 %).

Не учитывают пики, площадь которых менее 0.3 от площади пика ибупрофена на хроматограмме раствора сравнения (менее 0.03 %).

Примесь F. Определение проводят методом ГХ (ОФС «Газовая хроматография»).

Раствор для метилирования. К 1.0 мл диметилформамида диметилацетата прибавляют 1,0 мл пиридина и разбавляют этилацетатом до объёма 10,0 мл.

Испытуемый раствор. В хроматографический флакон помещают 50 мг субстанции, растворяют в 1 мл этилацетата, прибавляют 1 мл раствора для метилирования, флакон герметизируют и выдерживают при температуре 100°C в течение 20 мин. Флакон охлаждают, продувают азотом до удаления реагентов и растворяют остаток в 5 мл этилацетата.

Раствор сравнения. В 10,0 мл этилацетата растворяют 0.5 мг фармакопейного стандартного образца примеси F (3-[4-(2-метилпропил)фенил]пропановая кислота [65322-85-2]). В хроматографический флакон помещают 1.0 мл полученного раствора,

прибавляют 1 мл раствора для метилирования, флакон герметизируют и выдерживают при температуре 100°C в течение 20 мин. Флакон охлаждают, продувают азотом до удаления реагентов и растворяют остаток в 5.0 мл этилацетата.

Хроматографические условия

Колонка	кварцевая капиллярная 25 м × 0.53 мм, покрытая слоем полиэтиленгликоля 20 000, 2 мкм	
Детектор	пламенно-ионизационный	
Газ-носитель	гелий для хроматографии	
Скорость потока	5 мл/мин;	
Температура	Инжектор	200°C
	Колонка	150°C
	Детектор	250°C
Объём пробы	1 мкл	
Время хроматографирования	2-кратное от времени удерживания пика ибупрофена.	

Хроматографируют испытуемый раствор и раствор сравнения.

Относительное время удерживания соединений. Ибупрофен – 1 (около 17 мин); примесь F – около 1.5.

Допустимое содержание примеси. На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика примеси F не должна превышать площадь пика примеси F на хроматограмме раствора сравнения (не более 0.1 %).

Хлориды. К 0.2 г субстанции прибавляют несколько капель спирта во избежание комкования и прилипания препарата к стенкам сосуда, затем добавляют 100 мл воды, перемешивают при 50°C на магнитной мешалке в течение 1 ч, затем охлаждают и проводят измерения в диапазоне от 20 до 25°C. Опалесценция, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать опалесценцию эталонного раствора (ОФС.1.2.2.2.0009 «Хлориды», ГФ XV).

Потеря в массе при высушивании. 1 г (точная навеска) субстанции высушивают в открытом бюксе при температуре от 100 до 105°C в сушильном шкафу до постоянной массы, затем охлаждают в эксикаторе и взвешивают с закрытой крышкой. Потеря в

массе должна быть не менее 6% и не более 12% (ОФС.1.2.1.0010 «Потеря в массе при высушивании», ГФ XV, способ 1).

Общая зола. Общая зола из 1 г (точная навеска) субстанции не должна превышать 10% в пересчете на сухое вещество (ОФС.1.2.2.2.0013 «Зола общая», ГФ XV).

Сульфатная зола. Сульфатная зола из 1 г (точная навеска) субстанции не должна превышать 3.3% в пересчете на сухое вещество (ОФС.1.2.2.2.0014 «Сульфатная зола», ГФ XV).

Тяжелые металлы. Содержание тяжелых металлов не должно превышать 0.001%. Определение проводят в соответствии с ОФС.1.2.2.2.0012 «Тяжёлые металлы» (метод 3Б) в зольном остатке, полученном в испытании «Сульфатная зола», с использованием эталонного раствора 2.

Остаточные органические растворители. Определение этанола производят с помощью газовой хроматографии (ОФС.1.2.1.2.0004 «Газовая хроматография», ГФ XV).

Требования к прибору

Тип детектора – пламенно-ионизационный.

Колонка – капиллярная ВР21 длиной 50 м и внутренним диаметром 0.32 мм. Сорбент – полиэтиленгликоль с размерами частиц 0.5 мкм (или аналогичная колонка).

Метод введения пробы – ввод жидкой пробы в испаритель микрошприцем, объем вводимой пробы – 1 мкл.

Температура испарителя - $200 \pm 10^\circ\text{C}$. Температура колонки - $50 \pm 5^\circ\text{C}$. Температура детектора – 200°C .

Газ-носитель – аргон, азот или гелий, расход – 25 мл/мин.

Калибровка прибора

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5 мл ацетонитрила и 0.01 г (точная навеска) этанола. Содержимое колбы тщательно перемешивают и доводят объем до метки ацетонитрилом при постоянном перемешивании (раствор А).

1 мкл раствора А вводят в хроматограф, получая не менее 3 хроматограмм.

Раствор А должен быть использован в течение 30 мин после его приготовления.

Приготовление испытуемой пробы

В стакан вместимостью 50 мл помещают 25 мл ацетонитрила, закрывают пленкой во избежание испарения и нагревают до 50°C . В стакан с нагретым ацетонитрилом медленно присыпают 0.1 г (точная навеска) субстанции и перемешивают на магнитной

мешалке при нагревании в течение часа для полной экстракции этанола в раствор. Фильтруют часть смеси через микрофильтр, используя данный фильтрат для определения этанола.

Количественное определение

Количественное определение проводят методом сравнения со стандартным образцом.

1 мкл фильтрата пробы вводят в хроматограф.

Количественное содержание этилового спирта в субстанции вычисляют по формуле:

$$\omega = \frac{S_1 \cdot a_1}{S_0 \cdot a_0} \cdot W$$

где S_1 – площадь пика на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика на хроматограмме раствора А (среднее из трех);

a_0 – навеска стандартного образца этанола, г;

a_1 – навеска субстанции, г;

W – влажность препарата, %.

Содержание этилового спирта не должно превышать 0.5% в пересчете на сухое вещество согласно ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители», ГФ XV.

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии с ОФС.1.2.4.0002.18 “Микробиологическая чистота”, ГФ XIV, ч. 1, с. 1129, Категория 3А “Твердые (неводные) препараты для приема внутрь”.

В 1 г субстанции допускается наличие аэробных бактерий не более 10^3 КОЕ (суммарно), грибов не более 10^2 КОЕ (суммарно). Не допускается наличие микроорганизмов *Escherichia coli* в 1 г субстанции.

Количественное определение. Определение проводят методом титриметрии (ОФС.1.2.3.0029 «Титриметрия (титриметрические методы анализа)»).

Около 0.5 г (точная навеска) субстанции растворяют в 100 мл дистиллированной воды и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до появления розового окрашивания (индикатор – фенолфталеина раствор 0.1 %).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0.1 М раствора натрия гидроксида соответствует 20.63 мг ибупрофена $C_{13}H_{18}O_2$.

Хранение. Хранить в закрытых стеклянных или пластиковых емкостях при температуре не выше 25°C в защищенном от света месте.

Срок годности. 3 года.

Назначение. Для лечения воспалительных заболеваний.

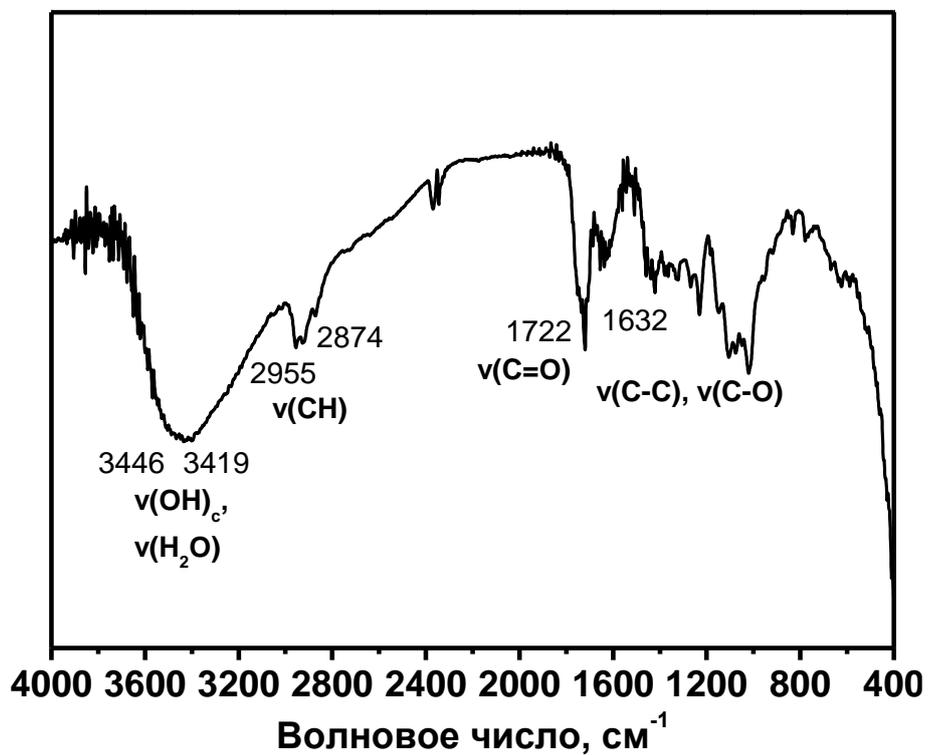


Рисунок 41 – ИК-спектр субстанции П/ИБП 6

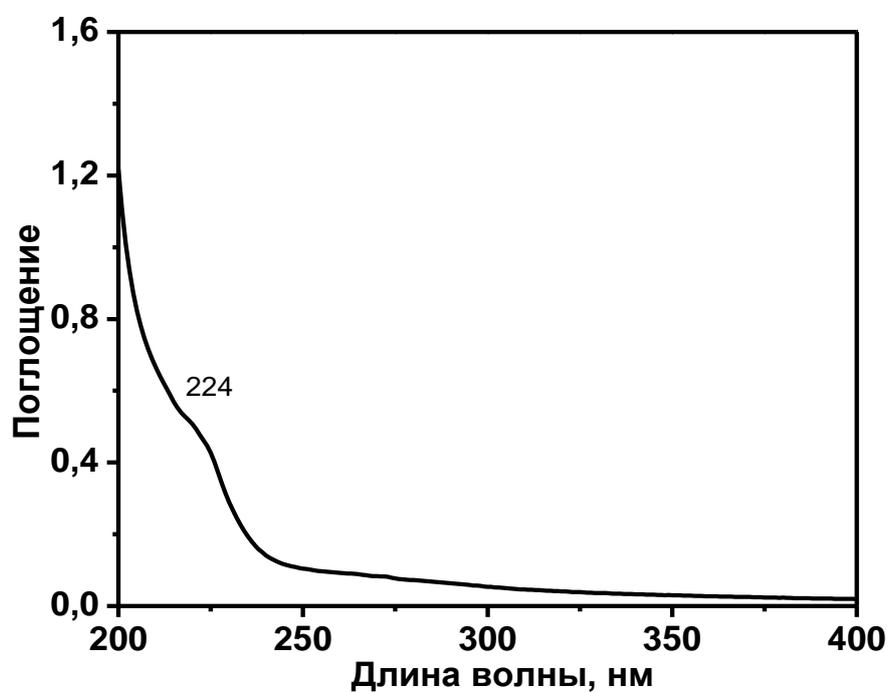


Рисунок 42 – УФ-спектр субстанции П/ИБП 6

Проект фармацевтической статьи на комплекс пектата натрия
с тетрациклином ПГNa/ТС 5

ПРОЕКТ

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Номер реестровой записи _____

Дата включения в государственный реестр лекарственных средств

« ____ » _____ 20__ г.

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

Комплекс пектата натрия с тетрациклином ПГNa/ТС 5

СУБСТАНЦИЯ-ПОРОШОК

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ УПАКОВКА)

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

СПЕЦИФИКАЦИЯ

Комплекс пектата натрия с тетрациклином ПГNa/ТС 5, субстанция - порошок

В соответствии с ОФС.1.1.0006 «Фармацевтические субстанции», ГФ XV.

№	Наименование показателя	Норма	Методы испытания
1	Описание	Аморфный порошок от темно-бежевого до коричневого цвета	Органолептический
2	Растворимость	Умеренно медленно (не менее 1 часа при температуре 50°C и перемешивании) растворим в воде с образованием опалесцирующего раствора	ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость», ГФ XV
3	Подлинность	ИК-спектр субстанции должен быть идентичен приложенному спектру (рисунок 43) УФ-спектр субстанции должен быть идентичен приложенному спектру (рисунок 44) Угол удельного оптического вращения 0.5%-о водного раствора при длине кюветы 62 мм должен быть не менее 150, не более 180 (°)·мл·дм ⁻¹ ·г ⁻¹	ОФС.1.2.1.1.0002 «Спектрометрия в средней инфракрасной области», ГФ XV ОФС.1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях», ГФ XV ОФС.1.2.1.0018 «Оптическое вращение», ГФ XV
4	Прозрачность раствора	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды должен быть прозрачным	ОФС.1.2.1.0007 «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей», ГФ XV

	1	2	3
5	Цветность раствора	Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен иметь жёлтый цвет	ОФС.1.2.1.0006 «Степень окраски жидкостей», ГФ XV
6	pH раствора	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды должен иметь pH не менее 5.0, не более 6.5	ОФС.1.2.1.0004 «Ионометрия», ГФ XV, метод 3
7	Родственные примеси	На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика примесей А, В, С и D не должна превышать определенных значений	ОФС.1.2.1.2.0005 «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ГФ XV
8	Потеря в массе при высушивании	Не менее 6.0%, не более 12.0%	ОФС.1.2.1.0010 «Потеря в массе при высушивании», ГФ XV, способ 1
7	Общая зола	Не более 20.0% в пересчете на сухое вещество	ОФС.1.2.2.2.0013 «Зола общая», ГФ XV
8	Сульфатная зола	Не более 3.3%	ОФС.1.2.2.2.0014 «Сульфатная зола», ГФ XV
9	Тяжелые металлы	Не более 0.001%	ОФС.1.2.2.2.0012 «Тяжелые металлы», ГФ XV, метод 1.
10	Остаточные органические растворители	Содержание этилового спирта не более 0.5% в пересчете на АСВ	ОФС.1.2.1.2.0004 «Газовая хроматография», ГФ XV
11	Микробиологическая чистота	Категория 3А	ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота», ГФ XIV, ч. 1, с. 1129

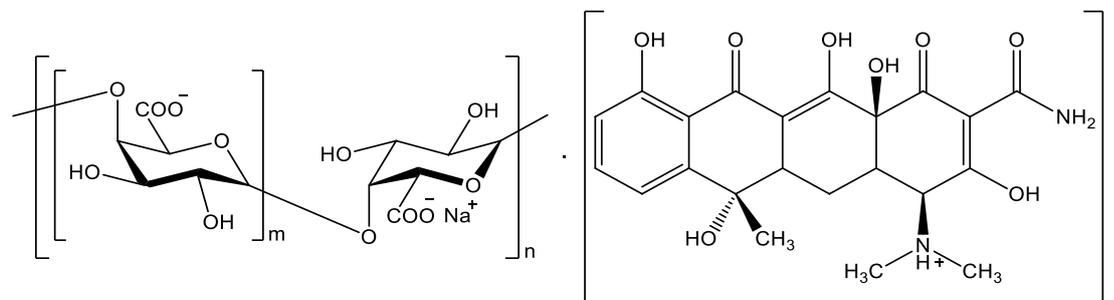
	1	2	3
12	Количественное определение	Содержание тетрациклина в фармсубстанции не менее 6.0% и не более 7.4%	ОФС.1.2.1.1.0005 «Атомно-абсорбционная спектрометрия», ГФ XV; ОФС.1.2.1.0024 «Автоматический элементный анализ», ГФ XV

Комплекс пектата натрия с тетрациклином ПГNa/ТС 5

Полное химическое название:

Молекулярный комплекс полигалактуроната натрия с тетрациклином ПГNa/ТС 5

Структурная формула:



Эмпирическая формула:

$[C_6H_7O_6Na]_n[C_6H_7O_6]_m[C_{22}H_{25}N_2O_8]_o$, где $n = 49$, $m = 4$, $o = 4$.

Молекулярная масса:

Молекулярная масса субстанции зависит от молекулярно-массового распределения в исходном пектине, которая определяется методом вискозиметрии по характеристической вязкости: 10.85 кДа.

Описание. Аморфный порошок от темно-бежевого до коричневого цвета.

Растворимость. К 1 г субстанции добавляют несколько капель спирта во избежание комкования и прилипания препарата к стенкам сосуда, затем добавляют точно 100 мл воды, перемешивают при 50°C на магнитной мешалке в течение 1 часа. Образуется прозрачный раствор.

Подлинность.

Спектрометрия в средней инфракрасной области.

Тщательно растирают 1–2 мг испытуемого вещества с 0.3–0.4 г измельченного и высушенного калия бромидом, добиваясь необходимой однородности, и прессуют диск при давлении около 800 МПа (8 т/см²). Инфракрасный спектр субстанции, снятый в области от 4000 до 400 см⁻¹, по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку 43 спектра комплекса пектина с ибупрофеном (ОФС.1.2.1.1.0002 «Спектрометрия в средней инфракрасной области», ГФ XV).

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях.

В стакан вместимостью 100 мл помещают 50 мл воды, добавляют 0.5 г субстанции (точная навеска) и перемешивают при 50°C на магнитной мешалке в течение 1 часа. Затем содержимое стакана количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, используя воронку с длинным носиком. Стакан ополаскивают 10 мл воды и переливают в мерную колбу, операцию повторяют еще 2 раза. Содержимое мерной колбы охлаждают до комнатной температуры и доводят водой до метки. Снимают спектр в ультрафиолетовой и видимой области (200 – 400 нм), который должен соответствовать рисунку 44 спектра комплекса пектина с ибупрофеном (ОФС.1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях», ГФ XV).

Измерение удельного оптического вращения.

В стакан вместимостью 100 мл помещают 50 мл воды, добавляют 0.5 г субстанции (точная навеска) и перемешивают при 50°C на магнитной мешалке в течение 1 часа. Затем содержимое стакана количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, используя воронку с длинным носиком. Стакан ополаскивают 10 мл воды и переливают в мерную колбу, операцию повторяют еще 2 раза. Содержимое мерной колбы охлаждают до комнатной температуры и доводят водой до метки. Определяют удельный угол вращения плоскости поляризации раствора с точной концентрацией (в пересчёте на сухое вещество) при длине волны 589 нм (длина кюветы 62 мм). Рассчитанный по формуле угол удельного оптического вращения должен быть не менее $+150$ (°)·мл·дм⁻¹·г⁻¹ и не более $+180$ (°)·мл·дм⁻¹·г⁻¹ (ОФС.1.2.1.0018 «Оптическое вращение», ГФ XV).

Прозрачность раствора. К 0.5 г субстанции прибавляют несколько капель спирта во избежание комкования и прилипания препарата к стенкам сосуда, затем добавляют 100 мл воды, перемешивают при 50°C на магнитной мешалке в течение 1 ч 10 мл полученного раствора должна быть прозрачными (ОФС.1.2.1.0007 «Прозрачность и степень опалесценции (мутности) жидкостей», ГФ XV).

Цветность раствора. Раствор, полученный в испытании «Прозрачность раствора», должен иметь жёлтое окрашивание (ОФС.1.2.1.0006 «Степень окраски жидкостей», ГФ XV).

pH раствора. К 0.5 г субстанции прибавляют несколько капель спирта во избежание комкования и прилипания препарата к стенкам сосуда, затем добавляют 100 мл воды,

перемешивают при 50°C на магнитной мешалке в течение 1 ч, затем охлаждают и проводят измерения в диапазоне от 20 до 25°C. рН полученного раствора должна быть не менее 5.0, не более 6.5 (ОФС.1.2.1.0004 «Ионометрия», ГФ XV, метод 3).

Родственные примеси. *Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).*

Растворы готовят непосредственно перед использованием.

Раствор дикалия гидрофосфата. В химический стакан вместимостью 1000 мл помещают 35 г дикалия гидрофосфата, растворяют в воде, доводят значение рН фосфорной кислотой разведённой 10% до 9.00, переносят раствор в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объём раствора водой до метки.

Раствор тетрабутиламмония гидросульфата. В химический стакан вместимостью 1000 мл помещают 10 г тетрабутиламмония гидросульфата, растворяют в воде, доводят значение рН натрия гидроксида раствором 8.5% до 9.00, переносят раствор в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объём раствора водой до метки.

Раствор динатрия эдетата. В химический стакан вместимостью 1000 мл помещают 40 г динатрия эдетата дигидрата, растворяют в воде, доводят значение рН натрия гидроксида раствором 8.5 % до 9.00, переносят раствор в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объём раствора водой до метки.

Подвижная фаза (ПФ). В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают раствор 80,0 г трет-бутилового спирта в 200 мл воды, прибавляют 100 мл раствора дикалия гидрофосфата, 200 мл раствор тетрабутиламмония гидросульфата, 10 мл раствора динатрия эдетата и доводят объём раствора водой до метки.

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 25.0 мг (точная навеска) субстанции, растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0,01 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Раствор стандартного образца тетрациклина гидрохлорида. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 25 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца тетрациклина гидрохлорида, растворяют в хлористоводородной кислоте растворе 0.01 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Раствор стандартного образца примеси А. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 15 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца примеси А,

растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0.01 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Раствор стандартного образца примеси С. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца примеси С, растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0.01 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Раствор стандартного образца примеси D. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 10 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца примеси D, растворяют в хлористоводородной кислоты растворе 0.01 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Раствор сравнения. В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 20.0 мл раствора стандартного образца примеси А, 10.0 мл раствора стандартного образца примеси С, 5.0 мл раствора стандартного образца примеси D и доводят объём раствора хлористоводородной кислоты раствором 0.01 М до метки.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1.0 мл раствора стандартного образца тетрациклина гидрохлорида, 2.0 мл раствора стандартного образца примеси А, 5.0 мл раствора стандартного образца примеси D и доводят объём раствора хлористоводородной кислоты раствором 0.01 М до метки.

Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1.0 мл раствора стандартного образца примеси С и доводят объём раствора хлористоводородной кислоты раствором 0.01 М до метки.

Примечание

Примесь А (4-эпитетрациклин): (4R,4aS,5aS,6S,12aS)-3,6,10,12,12a-пентагидрокси-4-(диметиламино)-6-метил-1,11-диоксо-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-октагидротетрацен-2-карбоксамид [79-85-6].

Примесь В: (4S,4aS,5aS,6S,12aS)-2-Ацетил-3,6,10,12,12a-пентагидрокси-4-(диметиламино)-6-метил-4a,5a,6,12a-тетрагидротетрацен-1,11(4H,5H)-дион [6542-44-5].

Примесь С (ангидротетрациклин): (4S,4aS,12aS)-3,10,11,12a-тетрагидрокси-4-(диметиламино)-6-метил-1,12-диоксо-1,4,4a,5,12,12a-гексагидротетрацен-2-карбоксамид [1665-56-1].

Примесь D (4-этиангидротетрациклин): (4R,4aS,12aS)-3,10,11,12a-тетрагидрокси-4-(диметиламино)-6-метил-1,12-диоксо-1,4,4a,5,12,12a-гексагидротетрацен-2-карбоксамид [7518-17-4].

Хроматографические условия

Колонка: 25.0 × 4.6 см, сополимер стирол-дивинилбензола, 8 мкм;

Температура колонки: 60°C;

Скорость потока: 1.0 мл/мин;

Детектор: спектрофотометрический, 254 нм;

Объем пробы: 20 мкл;

Хроматографируют раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, раствор для проверки пригодности хроматографической системы, раствор сравнения и испытуемый раствор.

Идентификация примесей. Для идентификации пиков примесей используются хроматограммы растворов для проверки пригодности и чувствительности хроматографической системы.

Пригодность хроматографической системы. На хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы:

- разрешение (RS) между пиками примеси А (пик 1) и тетрациклина (пик 2) должно быть не менее 2.5;
- разрешение (RS) между пиками тетрациклина (пик 2) и примеси D (пик 3) должно быть не менее 8.0;
- фактор асимметрии пика (AS) тетрациклина должен быть не более 1.25;
- на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы отношение сигнал/шум (S/N) для основного пика должно быть не менее 3.

Допустимое содержание примесей. На хроматограмме испытуемого раствора:

- площадь пика примеси А не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 5.0 %);
- площадь пика примеси В (выходит на хвосте основного пика) не должна превышать 0.4 площади пика примеси А на хроматограмме раствора сравнения (не более 2.0 %);
- площадь пика примеси С не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 1.0 %);

- площадь пика примеси D не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0.5 %).

Потеря в массе при высушивании. 1 г (точная навеска) субстанции высушивают в открытом бюксе при температуре от 100 до 105°C в сушильном шкафу до постоянной массы, затем охлаждают в эксикаторе и взвешивают с закрытой крышкой. Потеря в массе должна быть не менее 6% и не более 12% (ОФС.1.2.1.0010 «Потеря в массе при высушивании», ГФ XV, способ 1).

Общая зола. Общая зола из 1 г (точная навеска) субстанции не должна превышать 20% в пересчете на сухое вещество (ОФС.1.2.2.2.0013 «Зола общая», ГФ XV).

Сульфатная зола. Сульфатная зола из 1 г (точная навеска) субстанции не должна превышать 3.3% в пересчете на сухое вещество (ОФС.1.2.2.2.0014 «Сульфатная зола», ГФ XV).

Тяжелые металлы. Содержание тяжелых металлов не должно превышать 0,001%. Определение проводят в соответствии с ОФС.1.2.2.2.0012 «Тяжёлые металлы» (метод ЗБ) в зольном остатке, полученном в испытании «Сульфатная зола», с использованием эталонного раствора 2.

Остаточные органические растворители. Определение этанола производят с помощью газовой хроматографии (ОФС.1.2.1.2.0004 «Газовая хроматография», ГФ XV).

Требования к прибору

Тип детектора – пламенно-ионизационный.

Колонка – капиллярная ВР21 длиной 50 м и внутренним диаметром 0.32 мм. Сорбент – полиэтиленгликоль с размерами частиц 0.5 мкм (или аналогичная колонка).

Метод введения пробы – ввод жидкой пробы в испаритель микрошприцем, объем вводимой пробы – 1 мкл.

Температура испарителя - 200±10°C. Температура колонки - 50±5°C. Температура детектора – 200°C.

Газ-носитель – аргон, азот или гелий, расход – 25 мл/мин.

Калибровка прибора

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5 мл ацетонитрила и 0.01 г (точная навеска) этанола. Содержимое колбы тщательно перемешивают и доводят объем до метки ацетонитрилом при постоянном перемешивании (раствор А).

1 мкл раствора А вводят в хроматограф, получая не менее 3 хроматограмм.

Раствор А должен быть использован в течение 30 мин после его приготовления.

Приготовление испытуемой пробы

В стакан вместимостью 50 мл помещают 25 мл ацетонитрила, закрывают пленкой во избежание испарения и нагревают до 50°C. В стакан с нагретым ацетонитрилом медленно присыпают 0.1 г (точная навеска) субстанции и перемешивают на магнитной мешалке при нагревании в течение часа для полной экстракции этанола в раствор. Фильтруют часть смеси через микрофильтр, используя данный фильтрат для определения этанола.

Количественное определение

Количественное определение проводят методом сравнения со стандартным образцом.

1 мкл фильтрата пробы вводят в хроматограф.

Количественное содержание этилового спирта в субстанции вычисляют по формуле:

$$\omega = \frac{S_1 \cdot a_1}{S_0 \cdot a_0} \cdot W$$

где S_1 – площадь пика на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика на хроматограмме раствора А (среднее из трех);

a_0 – навеска стандартного образца этанола, г;

a_1 – навеска субстанции, г;

W – влажность препарата, %.

Содержание этилового спирта не должно превышать 0.5% в пересчете на сухое вещество согласно ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители», ГФ XV.

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии с ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота», ГФ XIV, ч. 1, с. 1129, Категория 3А «Твердые (неводные) препараты для приема внутрь».

В 1 г субстанции допускается наличие аэробных бактерий не более 10^3 КОЕ (суммарно), грибов не более 10^2 КОЕ (суммарно). Не допускается наличие микроорганизмов *Escherichia coli* в 1 г субстанции.

Количественное определение. Определение тетрациклина в субстанции производят двумя методами: методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ОФС.1.2.1.1.0005 «Атомно-абсорбционная спектроскопия», ГФ XV) по разнице содержания натрия в контрольном образце, не содержащем тетрациклина, и в фармацевтической субстанции; или методом автоматического элементного анализа (ОФС.1.2.1.0024 «Автоматический

элементный анализ», ГФ XV) по разнице содержания азота в контрольном образце, не содержащем тетрациклина, и в фармацевтической субстанции.

Хранение. Хранить в закрытых стеклянных или пластиковых емкостях при температуре не выше 25°C.

Срок годности. 3 года.

Назначение. Для лечения заболеваний, вызванных различными микроорганизмами.

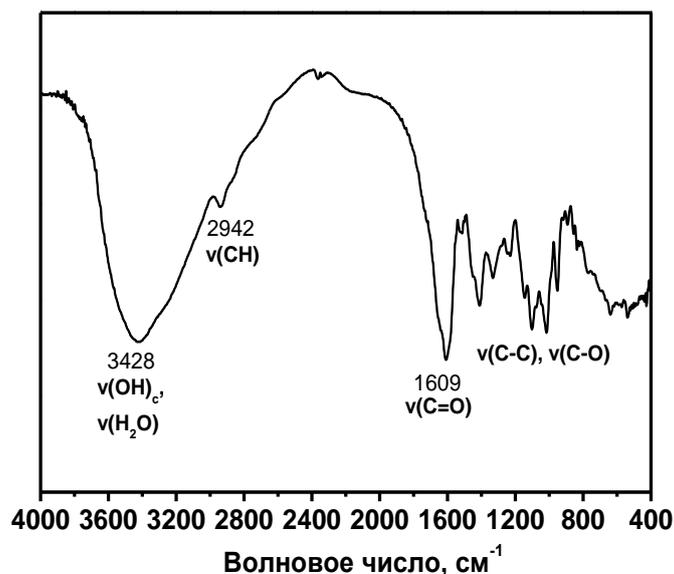


Рисунок 43 – ИК-спектр субстанции ПГNa/ТС 5

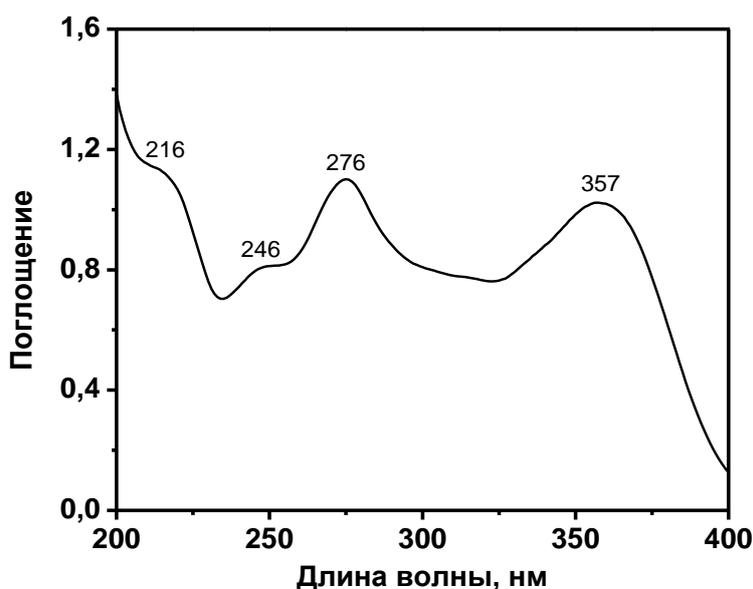


Рисунок 44 – УФ-спектр субстанции ПГNa/ТС 5

Акт испытаний физико-химических свойств фармацевтической субстанции
(комплекс пектина с ибупрофеном П/ИБП 6) от 19.06.2020 г.

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»
_____ Карасик А.А.
«__» июня 2020 г.

АКТ

испытаний физико-химических свойств фармацевтической субстанции от 19.06.2020 г.

Наименование пробы: Комплекс пектина с ибупрофеном П/ИБП 6

Даты испытания: 05.06.2020 г. – 19.06.2020 г.

Испытание проведено в соответствии с требованиями: ГФ XIV

Наименование показателя	Норма	Методы испытания	Результаты испытаний
Описание	Аморфный порошок бежевого цвета	Органолептический	Аморфный порошок бежевого цвета
Растворимость	Умеренно медленно (не менее 1 часа при температуре 50 °С и перемешивании на магнитной мешалке) растворим в воде с образованием опалесцирующего раствора	ОФС.1.2.1.0005.15 “Растворимость”, ГФ XIV, ч. 1, с. 543.	Умеренно медленно растворим в воде (при температуре 50°С и перемешивании в течение 1 часа)

1	2	3	4
Подлинность	<p>ИК-спектр субстанции должен быть идентичен приложенному спектру</p> <p>УФ-спектр субстанции должен быть идентичен приложенному спектру</p> <p>Угол удельного оптического вращения раствора 0.5 г субстанции в 100 мл воды должен быть не менее +150, не более 180 (°)*мл*дм⁻¹*г⁻¹</p>	<p>ОФС.1.2.1.1.0002.15 «Спектрометрия в инфракрасной области», ГФ XIV, ч. 1, с. 742</p> <p>ОФС.1.2.1.1.0003.1 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях», ГФ XIV, ч. 1, с. 750</p> <p>ОФС.1.2.1.0018.15 «Поляриметрия», ГФ XIV, ч. 1, с. 618</p>	<p>ИК спектр субстанции идентичен приложенному спектру (рисунок 45);</p> <p>УФ спектр субстанции идентичен приложенному спектру (рисунок 46);</p> <p>Угол удельного оптического вращения 0.5% раствора субстанции в воде составляет +151 (°)*мл*дм⁻¹*г⁻¹</p>
Прозрачность раствора	Раствор 0,5 г субстанции в 100 мл воды должен выдерживать сравнение с эталоном III или IV	ОФС.1.2.1.0007.15 «Прозрачность и степень мутности жидкостей», ГФ XIV, ч. 1, с. 554	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды выдерживает сравнение с эталоном III или IV
рН	Раствор 0,5 г субстанции в 100 мл воды должен иметь рН не менее 3.0, не более 4.5	ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия», ГФ XIV, ч. 1, с. 533.	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды имеет рН 3.7
Потеря в массе при высушивании	Не менее 6.0%, не более 12.0%	ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании», ГФ XIV, ч. 1, с. 568	5.2%
Общая зола	Не более 10% в пересчете на сухое вещество	ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая», ГФ XIV, ч. 1, с. 982	2.27%

1	2	3	4
Сульфатная зола	Не более 3.3%	ОФС.1.2.2.2.0014.15 “Сульфатная зола”, ГФ XIV, ч. 1, с. 984.	3.2%
Тяжелые металлы	Не более 0.001%	ОФС.1.2.2.2.0012.15 “Тяжелые металлы”, ГФ XIV, ч. 1, с. 978.	0.001%
Остаточные органические растворители	Содержание этилового спирта не более 0.5% в субстанции в пересчете на сухое вещество	ОФС.1.2.1.2.0004.15 “Газовая хроматография”, ГФ XIV, ч. 1, с. 890	<0.1%
Микробиологическая чистота	Категория 3А	ОФС.1.2.4.0002.18 “Микробиологическая чистота”, ГФ XIV, ч. 1, с. 1129	Соответствует
Количественное определение	Содержание ибупрофена в фармсубстанции не менее 13.5% и не более 16.5%	ОФС.2.1.0100.18 “Ибупрофен”, ГФ XIV, ч. 3, с. 570.	15.0%

Заключение: соответствует требованиям ГФ XIV.

Анализ выполнил:

Чекунков Е.В.

Микробиологический анализ

выполнил:

Волошина А.Д.

Проверил:

Минзанова С.Т.

Заведующий Технологической лабораторией:

Милуков В.А.

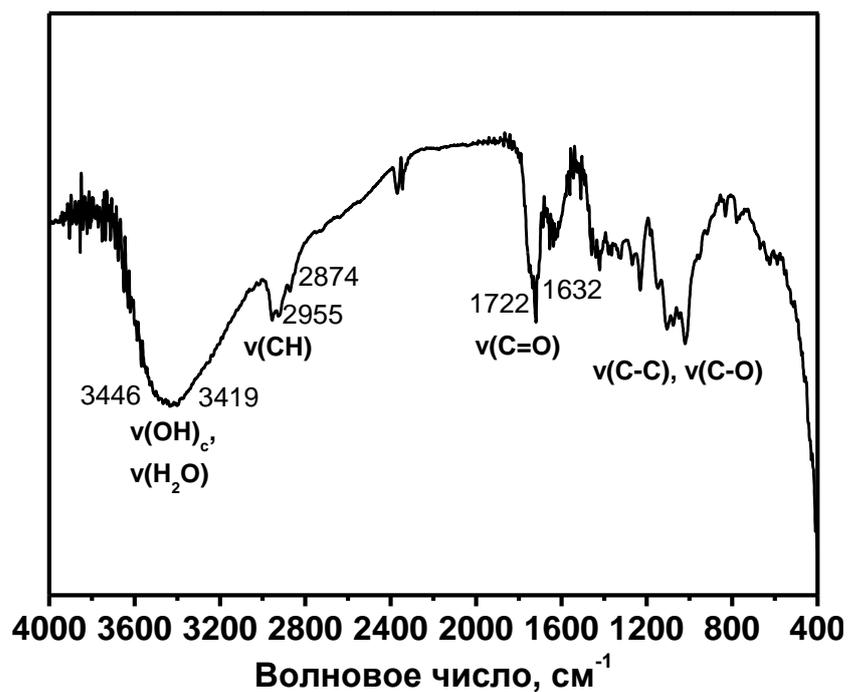


Рисунок 45 – ИК-спектр субстанции – комплекса пектина с ибупрофеном П/ИБП 6

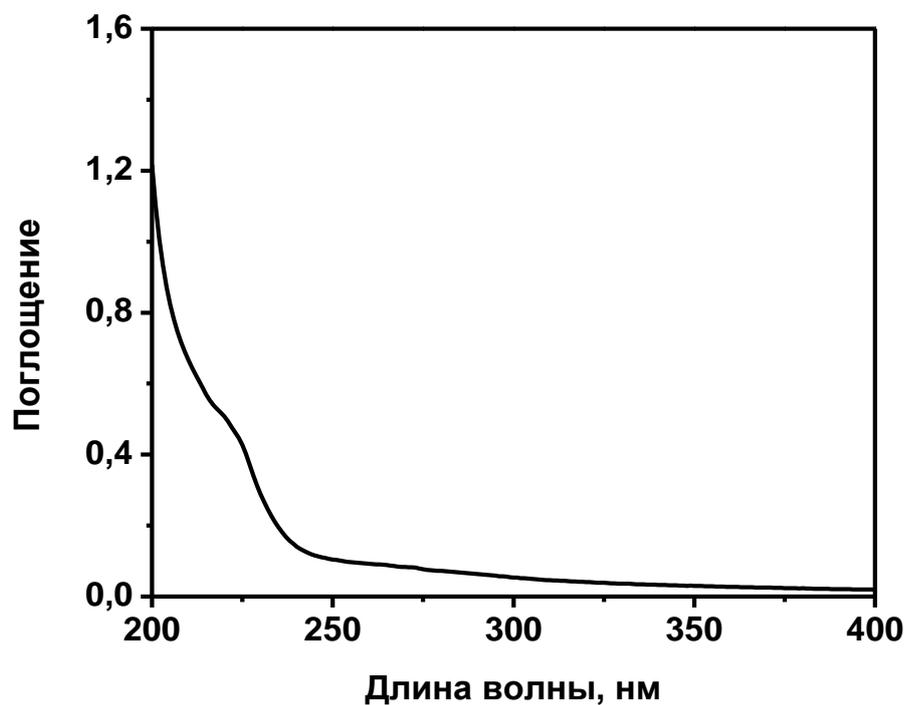


Рисунок 46 – УФ-спектр субстанции – комплекса пектина с ибупрофеном П/ИБП 6

Акт испытаний физико-химических свойств фармацевтической субстанции
(комплекс пектина с ибупрофеном П/ИБП 6) от 19.06.2023 г.

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» чл.-корр. _____ Карасик А.А.

«__» июня 2023 г.

АКТ

испытаний физико-химических свойств фармацевтической субстанции от 19.06.2023г.

Наименование пробы: Комплекс пектина с ибупрофеном П/ИБП 6

Даты испытания: 05.06.2023 г. – 19.06.2023 г.

Испытание проведено в соответствии с требованиями: ГФ XIV

Наименование показателя	Норма	Методы испытания	Результаты испытаний
Описание	Аморфный порошок бежевого цвета	Органолептический	Аморфный порошок бежевого цвета
Растворимость	Умеренно медленно (не менее 1 часа при температуре 50 °С и перемешивании на магнитной мешалке) растворим в воде с образованием опалесцирующего раствора	ОФС.1.2.1.0005.15 “Растворимость”, ГФ XIV, ч. 1, с. 543.	Умеренно медленно растворим в воде (при температуре 50°С и перемешивании в течение 1 часа)

1	2	3	4
Подлинность	<p>ИК-спектр субстанции должен быть идентичен приложенному спектру</p> <p>УФ-спектр субстанции должен быть идентичен приложенному спектру</p> <p>Угол удельного оптического вращения раствора 0.5 г субстанции в 100 мл воды должен быть не менее +150, не более 180 (°)*мл*дм⁻¹*г⁻¹</p>	<p>ОФС.1.2.1.1.0002.15 «Спектрометрия в инфракрасной области», ГФ XIV, ч. 1, с. 742</p> <p>ОФС.1.2.1.1.0003.1 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях», ГФ XIV, ч. 1, с. 750</p> <p>ОФС.1.2.1.0018.15 «Поляриметрия», ГФ XIV, ч. 1, с. 618</p>	<p>ИК спектр субстанции идентичен приложенному спектру (рисунок 47);</p> <p>УФ спектр субстанции идентичен приложенному спектру (рисунок 48);</p> <p>Угол удельного оптического вращения 0.5% раствора субстанции в воде составляет +175 (°)*мл*дм⁻¹*г⁻¹</p>
Прозрачность раствора	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды должен выдерживать сравнение с эталоном III или IV	ОФС.1.2.1.0007.15 «Прозрачность и степень мутности жидкостей», ГФ XIV, ч. 1, с. 554	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды выдерживает сравнение с эталоном III или IV
pH	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды должен иметь pH не менее 3.0, не более 4.5	ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия», ГФ XIV, ч. 1, с. 533.	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды имеет pH 4.3
Потеря в массе при высушивании	Не менее 6.0%, не более 12.0%	ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании», ГФ XIV, ч. 1, с. 568	7.3%
Общая зола	Не более 10.0% в пересчете на сухое вещество	ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая», ГФ XIV, ч. 1, с. 982	2.3%

1	2	3	4
Сульфатная зола	Не более 3.3%	ОФС.1.2.2.2.0014.15 “Сульфатная зола”, ГФ XIV, ч. 1, с. 984.	3.2%
Тяжелые металлы	Не более 0.001%	ОФС.1.2.2.2.0012.15 “Тяжелые металлы”, ГФ XIV, ч. 1, с. 978.	0.001%
Остаточные органические растворители	Содержание этилового спирта не более 0.5% в субстанции в пересчете на сухое вещество	ОФС.1.2.1.2.0004.15 “Газовая хроматография”, ГФ XIV, ч. 1, с. 890	<0.1%
Микробиологическая чистота	Категория 3А	ОФС.1.2.4.0002.18 “Микробиологическая чистота”, ГФ XIV, ч. 1, с. 1129	Соответствует
Количественное определение	Содержание ибупрофена в фармсубстанции не менее 13.5% и не более 16.5%	ОФС.2.1.0100.18 “Ибупрофен”, ГФ XIV, ч. 3, с. 570.	15%

Заключение: соответствует требованиям ГФ XIV.

Анализ выполнил:

Чекунков Е.В.

Микробиологический анализ

выполнил:

Волошина А.Д.

Проверил:

Минзанова С.Т.

Заведующий Технологической лабораторией:

Милуков В.А.

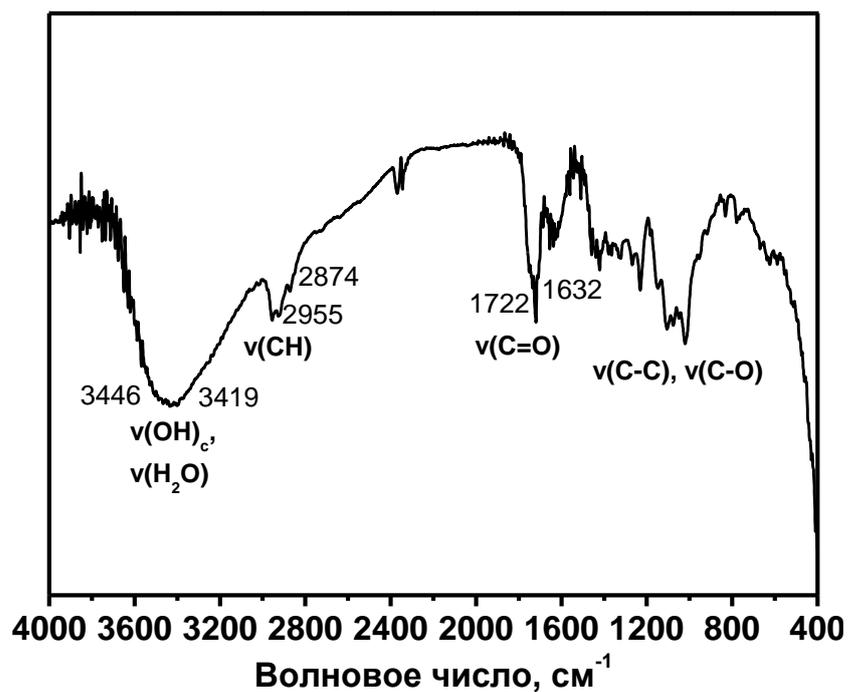


Рисунок 47 – ИК-спектр субстанции – комплекса пектина с ибупрофеном П/ИБП 6

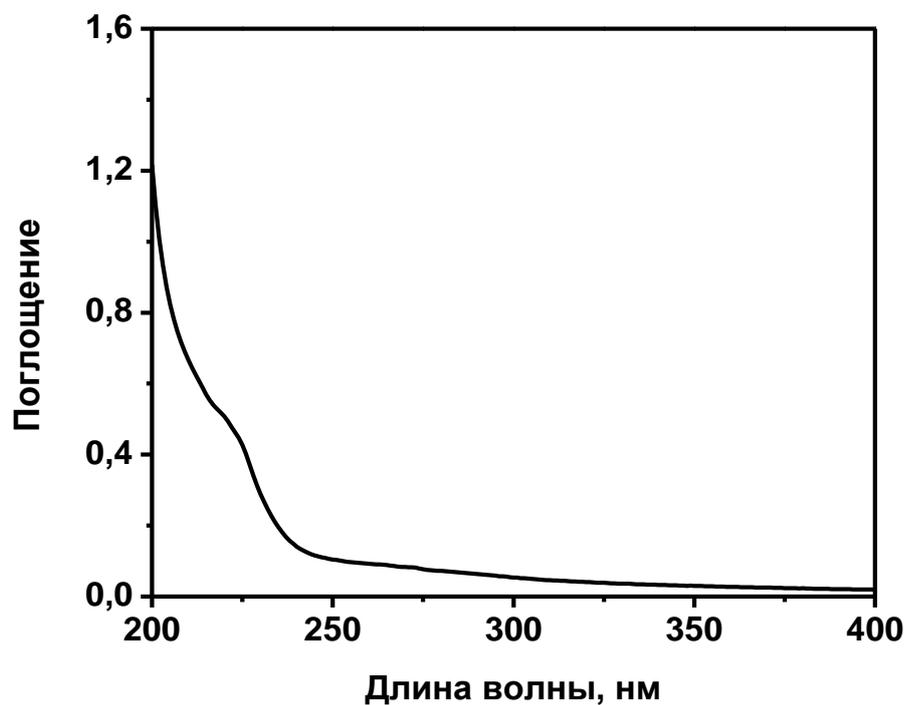


Рисунок 48 – УФ-спектр субстанции – комплекса пектина с ибупрофеном П/ИБП 6

Акт испытаний физико-химических свойств фармацевтической субстанции
(комплекс пектата натрия с тетрациклином ПГNa/ТС 5) от 19.06.2020 г.

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»
_____ Карасик А.А.
«__» июня 2020 г.

АКТ

испытаний физико-химических свойств фармацевтической субстанции от 19.06.2020 г.

Наименование пробы: Комплекс пектина с тетрациклином ПГNa/ТС 5

Даты испытания: 05.06.2020 г. – 19.06.2020 г.

Испытание проведено в соответствии с требованиями: ГФ XIV

Наименование показателя	Норма	Методы испытания	Результаты испытаний
Описание	Аморфный порошок от темно-бежевого до коричневого цвета	Органолептический	Аморфный порошок светло-коричневого цвета
Растворимость	Умеренно медленно (не менее 1 часа при температуре 50 °С и перемешивании на магнитной мешалке) растворим в воде с образованием опалесцирующего раствора	ОФС.1.2.1.0005.15 “Растворимость”, ГФ XIV, ч. 1, с. 543.	Умеренно медленно растворим в воде (при температуре 50°С и перемешивании в течение 1 часа)

1	2	3	4
Подлинность	<p>ИК-спектр субстанции должен быть идентичен приложенному спектру</p> <p>УФ-спектр субстанции должен быть идентичен приложенному спектру</p> <p>Угол удельного оптического вращения раствора 0.5 г субстанции в 100 мл воды должен быть не менее +150, не более 180 (°)*мл*дм⁻¹*г⁻¹</p>	<p>ОФС.1.2.1.1.0002.15 «Спектрометрия в инфракрасной области», ГФ XIV, ч. 1, с. 742</p> <p>ОФС.1.2.1.1.0003.1 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях», ГФ XIV, ч. 1, с. 750</p> <p>ОФС.1.2.1.0018.15 «Поляриметрия», ГФ XIV, ч. 1, с. 618</p>	<p>ИК спектр субстанции идентичен приложенному спектру (рисунок 49);</p> <p>УФ спектр субстанции идентичен приложенному спектру (рисунок 50);</p> <p>Угол удельного оптического вращения 0.5% раствора субстанции в воде составляет +159 (°)*мл*дм⁻¹*г⁻¹</p>
Прозрачность раствора	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды должен выдерживать сравнение с эталоном III или IV	ОФС.1.2.1.0007.15 «Прозрачность и степень мутности жидкостей», ГФ XIV, ч. 1, с. 554	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды выдерживает сравнение с эталоном III или IV
рН	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды должен иметь рН не менее 5.0, не более 6.5	ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия», ГФ XIV, ч. 1, с. 533.	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды имеет рН 5.0
Потеря в массе при высушивании	Не менее 6.0%, не более 12.0%	ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании», ГФ XIV, ч. 1, с. 568	8.4%
Общая зола	Не более 10% в пересчете на сухое вещество	ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая», ГФ XIV, ч. 1, с. 982	2.27%

1	2	3	4
Сульфатная зола	Не более 3.3%	ОФС.1.2.2.2.0014.15 “Сульфатная зола”, ГФ XIV, ч. 1, с. 984.	3.2%
Тяжелые металлы	Не более 0.001%	ОФС.1.2.2.2.0012.15 “Тяжелые металлы”, ГФ XIV, ч. 1, с. 978.	0.001%
Остаточные органические растворители	Содержание этилового спирта не более 0.5% в субстанции в пересчете на сухое вещество	ОФС.1.2.1.2.0004.15 “Газовая хроматография”, ГФ XIV, ч. 1, с. 890	<0.1%
Микробиологическая чистота	Категория 3А	ОФС.1.2.4.0002.18 “Микробиологическая чистота”, ГФ XIV, ч. 1, с. 1129	Соответствует
Количественное определение	Содержание тетрациклина в фармсубстанции не менее 6.0% и не более 7.4%	ОФС.2.1.0186.18 “Тетрациклин”, ГФ XIV, ч. 3, с. 1610.	6.7%

Заключение: _____соответствует_____ требованиям ГФ XIV.

Анализ выполнил:

Чекунков Е.В.

Микробиологический анализ

выполнил:

Волошина А.Д.

Проверил:

Минзанова С.Т.

Заведующий Технологической лабораторией:

Милуков В.А.

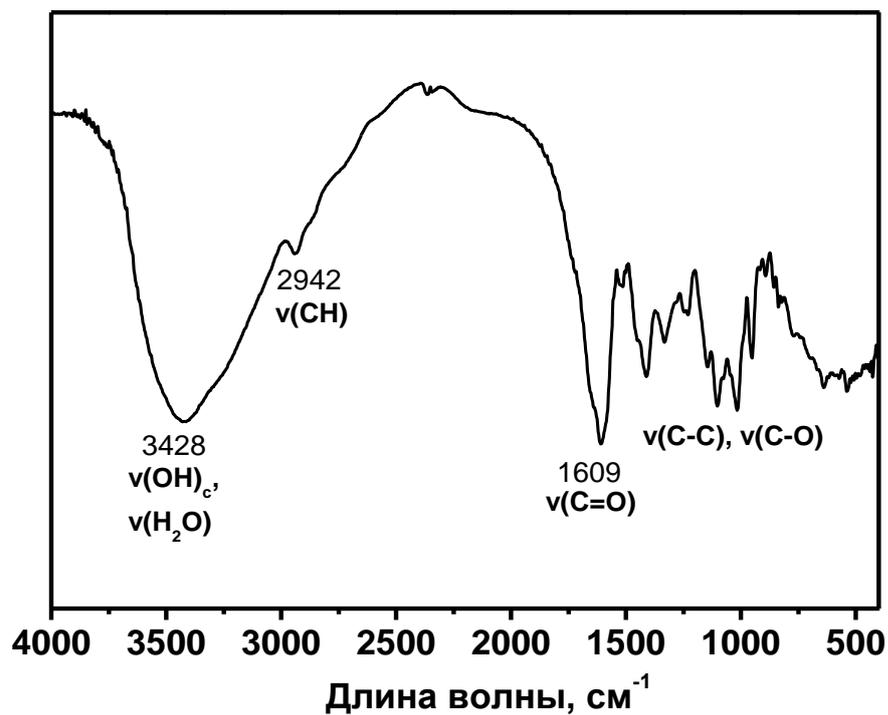


Рисунок 49 – ИК-спектр субстанции – комплекса пектата натрия с тетрациклином
ПГNa/ТС 5

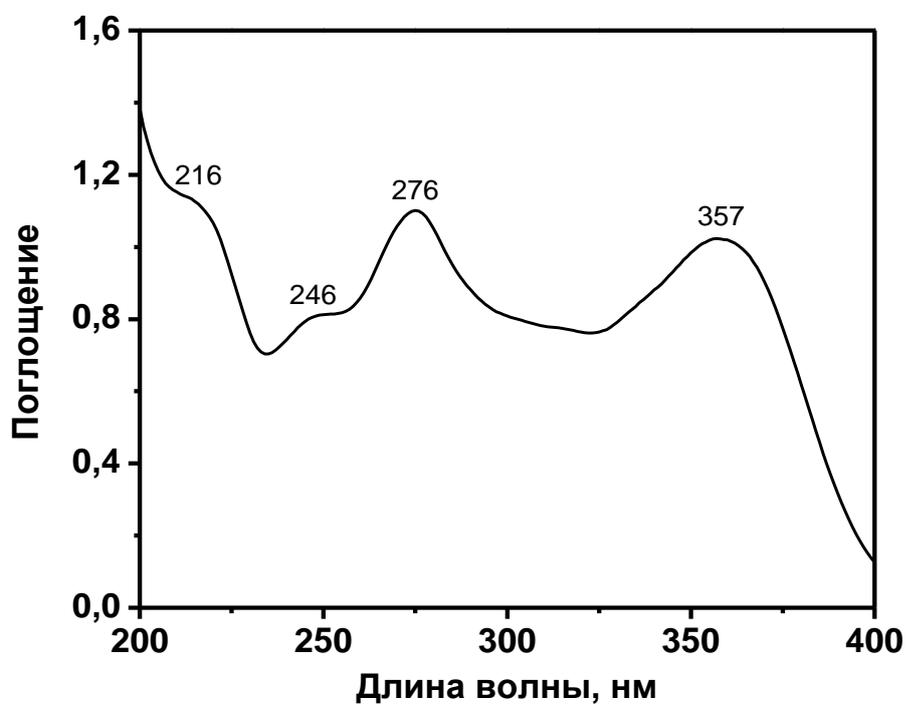


Рисунок 50 – УФ-спектр субстанции – комплекса пектата натрия с тетрациклином
ПГNa/ТС 5

Акт испытаний физико-химических свойств фармацевтической субстанции
(комплекс пектата натрия с тетрациклином ПГNa/ТС 5) от 19.06.2023 г.

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» чл.-корр.
_____ Карасик А.А.

« ___ » июня 2023 г.

АКТ

испытаний физико-химических свойств фармацевтической субстанции от 19.06.2023г.

Наименование пробы: Комплекс пектина с тетрациклином ПГNa/ТС 5

Даты испытания: 05.06.2023 г. – 19.06.2023 г.

Испытание проведено в соответствии с требованиями: ГФ XIV

Наименование показателя	Норма	Методы испытания	Результаты испытаний
Описание	Аморфный порошок от темно-бежевого до коричневого цвета	Органолептический	Аморфный порошок светло-коричневого цвета
Растворимость	Умеренно медленно (не менее 1 часа при температуре 50°C и перемешивании на магнитной мешалке) растворим в воде с образованием опалесцирующего раствора	ОФС.1.2.1.0005.15 “Растворимость”, ГФ XIV, ч. 1, с. 543.	Умеренно медленно растворим в воде (при температуре 50°C и перемешивании в течение 1 часа)

1	2	3	4
Подлинность	<p>ИК-спектр субстанции должен быть идентичен приложенному спектру</p> <p>УФ-спектр субстанции должен быть идентичен приложенному спектру</p> <p>Угол удельного оптического вращения раствора 0.5 г субстанции в 100 мл воды должен быть не менее +150, не более 180 (°)*мл*дм⁻¹*г⁻¹</p>	<p>ОФС.1.2.1.1.0002.15 «Спектрометрия в инфракрасной области», ГФ XIV, ч. 1, с. 742</p> <p>ОФС.1.2.1.1.0003.1 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях», ГФ XIV, ч. 1, с. 750</p> <p>ОФС.1.2.1.0018.15 «Поляриметрия», ГФ XIV, ч. 1, с. 618</p>	<p>ИК спектр субстанции идентичен приложенному спектру (рисунок 51);</p> <p>УФ спектр субстанции идентичен приложенному спектру (рисунок 52);</p> <p>Угол удельного оптического вращения 0.5% раствора субстанции в воде составляет +175 (°)*мл*дм⁻¹*г⁻¹</p>
Прозрачность раствора	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды должен выдерживать сравнение с эталоном III или IV	ОФС.1.2.1.0007.15 «Прозрачность и степень мутности жидкостей», ГФ XIV, ч. 1, с. 554	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды выдерживает сравнение с эталоном III или IV
pH	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды должен иметь pH не менее 5.0, не более 6.5	ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия», ГФ XIV, ч. 1, с. 533.	Раствор 0.5 г субстанции в 100 мл воды имеет pH 5.9
Потеря в массе при высушивании	Не менее 6.0%, не более 12.0%	ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании», ГФ XIV, ч. 1, с. 568	12.0%
Общая зола	Не более 20.0% в пересчете на сухое вещество	ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая», ГФ XIV, ч. 1, с. 982	19.8%

1	2	3	4
Сульфатная зола	Не более 3.3%	ОФС.1.2.2.2.0014.15 “Сульфатная зола”, ГФ XIV, ч. 1, с. 984.	3.2%
Тяжелые металлы	Не более 0.001%	ОФС.1.2.2.2.0012.15 “Тяжелые металлы”, ГФ XIV, ч. 1, с. 978.	0.001%
Остаточные органические растворители	Содержание этилового спирта не более 0.5% в субстанции в пересчете на сухое вещество	ОФС.1.2.1.2.0004.15 “Газовая хроматография”, ГФ XIV, ч. 1, с. 890	<0.1%
Микробиологическая чистота	Категория 3А	ОФС.1.2.4.0002.18 “Микробиологическая чистота”, ГФ XIV, ч. 1, с. 1129	Соответствует
Количественное определение	Содержание тетрациклина в фармсубстанции не менее 6.0% и не более 7.4%	ОФС.2.1.0186.18 “Тетрациклин”, ГФ XIV, ч. 3, с. 1610.	6.7%

Заключение: соответствует требованиям ГФ XIV.

Анализ выполнил:

Чекунков Е.В.

Микробиологический анализ

выполнил:

Волошина А.Д.

Проверил:

Минзанова С.Т.

Заведующий Технологической лабораторией:

Милуков В.А.

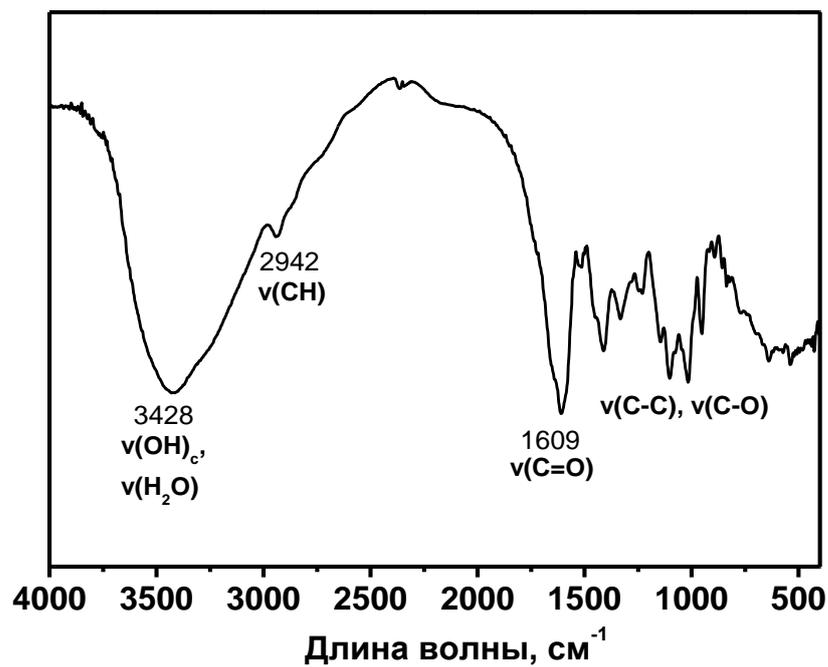


Рисунок 51 – ИК-спектр субстанции – комплекса пектата натрия с тетрациклином
ПГNa/ТС 5

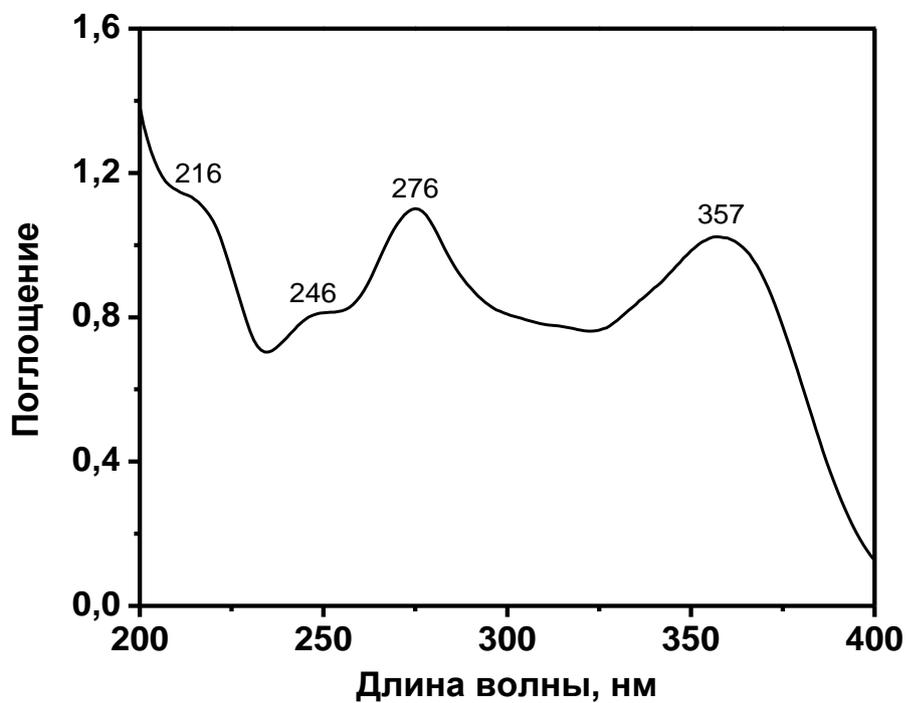


Рисунок 52 –УФ-спектр субстанции – комплекса пектата натрия с тетрациклином
ПГNa/ТС 5

Акт испытаний на микробиологическую чистоту фармацевтической субстанции
(комплекс пектина с ибупрофеном П/ИБП 6) от 19.06.2023 г.

**АКТ
ИСПЫТАНИЯ НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ ЧИСТОТУ**

«19» июня 2023 г.

Препарат: Комплекс пектина с ибупрофеном П/ИБП 6

Изготовитель: технологическая лаборатория ИОФХ им. А.Е. Арбузова – ОСП ФИЦ КазНЦ
РАН

Испытание проведено в соответствии с требованиями ГФ XIV, ч.1, с. 1129 ОФС.1.2.4.0002.18.

Наименование показателей	Требования ГФ XIV, ч.1 (ОФС.1.2.4.0002.18)	Результаты анализа для всех образцов
Общее число аэробных микроорганизмов	Не более 10^3 КОЕ /г	<10/г
Общее число дрожжевых и плесневых грибов	Не более 10^2 КОЕ /г	<10/г
<i>Escherichia coli</i> в 1г	Не допускается	Отсутствует

Заключение: Соответствует
(соответствие требованиям ГФ XIV, ч.1, с. 1129 (ОФС.1.2.4.0002.18))

Исполнитель
Заведующий Технологической лабораторией
Руководитель института

А.П. Любина
В.А. Милюков
А.А. Карасик

Акт испытаний на микробиологическую чистоту фармацевтической субстанции
(комплекс пектата натрия с тетрациклином ПГNa/ТС 5) от 19.06.2023 г.

**АКТ
ИСПЫТАНИЯ НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ ЧИСТОТУ**

«19» июня 2023 г.

Препарат: Комплекс пектата натрия с тетрациклином ПГNa/ТС 5

Изготовитель: технологическая лаборатория ИОФХ им. А.Е. Арбузова – ОСП ФИЦ КазНЦ
РАН

Испытание проведено в соответствии с требованиями ГФ XIV, ч.1, с. 1129 ОФС.1.2.4.0002.18.

Наименование показателей	Требования ГФ XIV, ч.1 (ОФС.1.2.4.0002.18)	Результаты анализа для всех образцов
Общее число аэробных микроорганизмов	Не более 10^3 КОЕ /г	<10/г
Общее число дрожжевых и плесневых грибов	Не более 10^2 КОЕ /г	<10/г
<i>Escherichia coli</i> в 1г	Не допускается	Отсутствует

Заключение: _____ Соответствует _____

(соответствие требованиям ГФ XIV, ч.1, с. 1129 (ОФС.1.2.4.0002.18))

Исполнитель
Заведующий Технологической лабораторией
Руководитель института

А.П. Любина
В.А. Милюков
А.А. Карасик