

На правах рукописи

ХЮИНЬ ТХИ ХОНГ ГАМ

**ИЗУЧЕНИЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ВИТАМИНА С ИЗ
МУЛЬТИВИТАМИННЫХ ПРЕПАРАТОВ И
ИЗМЕНЕНИЙ ВИТАМИННОГО СТАТУСА ПРИ ИХ
ПРИМЕНЕНИИ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва-2010

Работа выполнена в ГОУ ВПО Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И.М.Сеченова.

Научный руководитель: доктор фармацевтических наук, профессор
Галина Владиславовна Раменская

Официальные оппоненты:
доктор фармацевтических наук,
профессор Эма Максимовна Казьмина

кандидат фармацевтических наук Андрей Семенович Михалев

Ведущая организация: ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздравсоцразвития

Защита состоится «__»_____2010 г. в _____ч. на заседании Диссертационного Совета Д.208.040.09 при Первом Московском Государственном Медицинском Университете имени И.М.Сеченова по адресу: 119019, Москва, Никитский бульвар, д. 13.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Первого Московского Государственного Медицинского Университета имени И.М.Сеченова по адресу: 117998, Москва, Нахимовский проспект, д.49.

Автореферат разослан «__»_____2010 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета Д.208.040.09,
доктор фармацевтических наук,
профессор Наталья Петровна Садчикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Среди лекарственных средств, применяемых в медицине в лечебных и профилактических целях значительное место занимают витаминные препараты. Витамины входят и в состав мультивитаминных и поливитаминно-минеральных комплексов, и биологически активных добавок к пище. В настоящее время на фармацевтическом рынке всех стран существует большое количество различных поливитаминно-минеральных комплексов. В Российской Федерации зарегистрировано в качестве лекарственных средств 107 поливитаминно-минеральных комплексов и более 200 применяются как биологически активные добавки [www.rlsnet.ru].

Учитывая, что в состав комплексов входит большое число соединений с различными физико-химическими свойствами, между компонентами возможны все виды взаимодействия: химическое, фармацевтическое, фармакокинетическое и фармакодинамическое. Многие комбинации содержат аскорбиновую кислоту, которая является очень реакционно-способной с химической точки зрения.

Вопросам взаимодействия витаминов с пищей, лекарствами, вспомогательными веществами и между собой посвящены работы отечественных и зарубежных ученых [Ших Е.В., 2004; Vannucchi H., 1991 и др.]. Однако вопросы взаимодействия витаминов и микроэлементов по-прежнему не достаточно изучены, особенно в вопросах высвобождения и изменения при хранении.

Много внимания уделяется и вопросам витаминного статуса при приеме различных препаратов и биологически активных добавок к пище, содержащих витамины и микроэлементы [Демидова О. А., 2002; Коденцова В.М., 2006 и др.]. В то же время спектр препаратов настолько широк, что требует продолжения аналогичных исследований, особенно в сравнительном аспекте.

Все вышесказанное определило цель и задачи исследования.

Цель исследования. Целью настоящей работы являлось сравнительное изучение высвобождения витамина С из моно- и мультивитаминных комплексов и изменений витаминного статуса при их применении.

Задачи исследования.

1. Оценить возможность использования различных методов анализа для количественного определения витамина С в мультивитаминных комплексах и плазме крови.
2. Изучить изменение содержания витамина С в мультивитаминных комплексах в процессе хранения в течение срока годности.
3. Провести изучение высвобождения витамина С из различных мультивитаминных комплексов по тесту «Растворение».
4. Изучить изменение витаминного статуса при однократном приеме витамина С в составе монокомпонентного препарата и мультивитаминных комплексов.

Научная новизна полученных результатов.

Показано, что содержание витамина С в процессе хранения в течение срока годности практически не изменяется в препаратах «Драже аскорбиновой кислоты» и «Obimin», незначительно снижается в препаратах «Компливит», «Компливит с пониженным содержанием сахара» и «Алфавит», и статистически достоверно снижается в препарате «Витрум».

Установлено, что скорость и степень высвобождения витамина С из препарата «Драже аскорбиновой кислоты» происходит быстро и полно, практически не изменяется в процессе хранения в течение срока годности, высвобождение из комплексных препаратов «Компливит», «Компливит с пониженным содержанием сахара», «Витрум» и «Obimin» по сравнению с монопрепаратом значительно замедленно и в процессе хранения подвержено сильным колебаниям.

Из полученных нами данных следует, что наибольшее значение величины максимальной концентрации аскорбиновой кислоты при той же разовой вводимой дозе одной и той же группе добровольцев в виде различных лекарственных форм определяется при введении монопрепарата.

Практическая значимость работы.

Экспериментально доказано, что для оценки количественного содержания витамина С в мультивитаминных комплексах целесообразно использовать метод ВЭЖХ, который также может быть использован для изучения динамики концентрации аскорбиновой кислоты в плазме крови в фармакокинетических исследованиях и для своевременного выявления дефицита витаминов.

Витамины, макро- и микроэлементы, входящие в состав мультивитаминных комплексов влияют на биодоступность витамина С, что необходимо учитывать при назначении витаминных препаратов с профилактической или лечебной целью.

Положения, выносимые на защиту.

На защиту выносятся результаты исследований по изменению содержания аскорбиновой кислоты в монопрепарате, мультивитаминных комплексах в процессе хранения; результаты исследований по сравнительному изучению изменения высвобождения аскорбиновой кислоты из монопрепарата и мультивитаминных комплексов в процессе хранения; результаты по изучению фармакокинетики витамина С в составе монокомпонентного препарата и мультивитаминных комплексов.

Внедрение в практику. Результаты исследования внедрены в Филиал "Клиническая фармакология" Научного центра биомедицинских технологий РАМН (Акт внедрения от 10 мая 2010 г.).

Апробация работы. Апробация работы проведена на научно-практической конференции кафедры фармацевтической химии с курсом токсикологической химии фармацевтического факультета ММА им.И.М.Сеченова (май 2010). Результаты проведенных исследований представлены на конференциях: XVII Российском Национальном Конгрессе "Человек и Лекарство" (Москва, апрель 2010), научно-практической конференции "Современные аналитические задачи определения наркотиков, лекарственных средств и других компонентов в различных матрицах" (Москва, май 2010), XI Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» «Научные и прикладные аспекты концепции здоровья и здорового образа жизни» (Москва, 2010).

Публикация по работе. По результатам выполненных исследований опубликовано 3 печатных работы (1 из них в изданиях, рекомендованных ВАК РФ).

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа изложена на 118 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы (1 глава), описания материалов и методов исследований, 3-х глав экспериментальной части, заключения, общих выводов, списка литературы, включающего 112 наименований, из них 79—зарубежные, приложения. Работа содержит 30 таблиц, 7 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Характеристика препаратов, используемых в исследовании представлена в таблице 1.

Таблица 1

ПРЕПАРАТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ИССЛЕДОВАНИИ

Название препарата, серия и дата выпуска	Лекарственная форма, содержание аскорбиновой кислоты в мг	Производитель	Страна
Аскорбиновая кислота 100108; 08. 2008	драже, 50 мг	ОАО «Марбиофарм»	Россия
Компливит 970508; 06. 2008	таблетки, покрытые оболочкой, 50мг	ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА»	Россия
Компливит с пониженным содержанием сахара 291107; 12. 2007	таблетки, покрытые оболочкой, 50мг	ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА»	Россия
Витрум UR394В; 12. 2006	таблетки, покрытые оболочкой, 60мг	Unipharm	США
Алфавит 686868ВВ; 08.2007	таблетки, покрытые оболочкой, 80мг	ЗАО «АКВИОН»	Россия
Obimin 805211; 06. 2008	таблетки, покрытые оболочкой, 100мг	United Pharma	Вьетнам

Средства измерений

Жидкостной хроматограф фирмы "Shimadzu" с флюориметрическим детектором модели "RF-530".

Жидкостной хроматограф фирмы "Shimadzu" со спектрофотометрическим детектором модели "SPD-6A".

Колонка хроматографическая Диасорб-130-С16Т, 250*4 мм, 7 мкм (Россия).

Колонка хроматографическая Nucleosil C18, 200*5 мм, 5 мкм (Россия). Хроматографы были оборудованы петлевым краном-дозатором (инжектором для ввода пробы) типа «Reodyne 7125» (США) с петлей ввода на 100 мкл.

Для ввода проб в петлю хроматографа использовались шприцы «Hamilton» (США). В качестве вспомогательного оборудования применялась центрифуга «Heraeus-christ Labofuge», весы лабораторные, шейкер, вортекс.

Для изучения высвобождения использовали аппарат типа «Вращающаяся корзинка» ERWEKA DT 600.

Растворы и их приготовление для ВЭЖХ (для количественного определения витамина С в мультивитаминных препаратах в процессе хранения)

1. Стандартный раствор. 10 мг витамина С переносили в 100 мл мерную колбу и растворяли в смеси метанол : вода (30:70). Затем разводили серию растворов: отбирали по 10 мл полученного раствора и разводили таким образом, чтобы концентрация витамина С составила 0,1 — 100 мкг/мл. Использовали свежеприготовленный раствор.

2. Подвижная фаза - ацетонитрил-фосфатный буфер, (20:80) рН = 2,35 с введением ион-парного реагента С7/8 (гептан-1-сульфонат и октан-1-сульфонат натрия) (1,2 мг/л).

Приготовление 0,001М раствора 2,6-дихлорфенолиндофеналата натрия (реактив Тильманса).

220 мг 2,6-дихлорфенолиндофеналата натрия растворяли в 600 мл горячей свежeproкипяченной дистиллированной воды. После охлаждения раствора его фильтровали в мерную колбу на 1л и доводили до метки водой. Для стабилизацииготавливаемого реактива к нему добавляли бикарбонат натрия из расчета 0,18 г на 1 л реактива, что позволяло продлить срок его

годности. Реактив Тильманса хранили в холодильнике в темной посуде с плотно завинчивающейся пробкой. Срок годности – 3 суток.

Растворы и их приготовлении для ВЭЖХ (для определения витамина С в плазме крови)

1. Раствор 1,2-диамино-4,5-диметоксибензола (DDB): 16,4 мг 1,2-диамино-4,5-диметоксибензола растворяли в 5,0 мл 0,1 М натрия тиосульфата (стабилизатор DDB) и разводили до 40 мл 0,1 М ацетатным буфером (pH=4,5). Раствор хранили в темном месте и использовали в этот же день.

2. Раствор диметокси-3-пропил-2(1H)-квиноксалинона (DPQ): 2,86 мг диметокси-3-пропил-2(1H)-квиноксалинона растворяли в 1000 мл метанола. Раствор хранили при комнатной температуре (15-25°C) в темном месте не более двух месяцев.

3. Раствор йода: 12,7 мг йода растворяли в 100 мл 1,5 мМ калий иодида. Использовали свежеприготовленный раствор.

4. Раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ) 0,6 М.

5. Подвижная фаза. Смесь метанола с водой в соотношении 50: 50.

Все полученные экспериментальные данные были подвержены статистической обработке в соответствии с требованиями ГФ XI, выпуск 1 с помощью пакета статистических программ "EXCEL". Коэффициент корреляции составил 95%.

Содержание витамина С

1. Изучение изменения содержания аскорбиновой кислоты в мультивитаминных препаратах в процессе хранения

1.1. Количественное определение аскорбиновой кислоты в исследуемых препаратах

Метод ВЭЖХ

100 мкл каждого из серии стандартных растворов, содержащих 0,1-100 мкг/мл витамина С вводили в колонку хроматографа. Условия проведения анализа: колонка Диасорб-130-С16Т, 250мм x 4мм, 7мкм; подвижная фаза: ацетонитрил-фосфатный буфер (20:80) с введением ион-парного реагента С7/8 (1,2 мг/л); длина волны 254 нм, скорость потока подвижной фазы 0,8 мл/мин. В этих условиях время удерживания витамина С - 2,5 мин.

Анализируемые таблетки в количестве 20 штук помещали в ступку, измельчали и переносили в мерную колбу на 20 мл, доводили до метки смесью метанол : вода (30:70) и обрабатывали ультразвуком в течение 15 минут и центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин. Затем раствор фильтровали через фильтр 0,45 мкм. Далее 100 мкл анализируемых проб вводили в колонку хроматографа в тех же хромагографических условиях.

Количественное определение витамина С проводилось методом абсолютной калибровки. Зависимость концентрации витамина С от величины пика в измеряемом диапазоне носила линейный характер (коэффициент корреляции 0,9895). Чувствительность метода - 0,1 мкг/мл, относительная погрешность составляла 5%.

Метод йодатометрии

Взвешивали 20 драже (или таблеток) с точностью до 0,0002 г и определяли среднюю массу драже (или таблеток) соответственно требования ГФ XI. Драже (или таблеток) измельчались в ступке с помощью пестика до однородного порошка без крупных включений оболочки.

Точную навеску порошка растертых драже или таблеток с содержанием около 0,1 г кислоты аскорбиновой количественно переносили водой в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора дистиллированной водой до метки, перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр «синяя лента»; первые порции фильтрата отбрасывали. 10 мл полученного раствора помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 1 мл 2 % раствора хлористоводородной кислоты, 0,5 мл 1 % раствора калия йодида, 2 мл 0,5 % раствора крахмала, дистиллированной

воды до общего объема 20 мл и титровали раствором калия йодата 0,0167 М до появления стойкого светло- синего окрашивания.

Погрешность метода составляла 11%, что связано с «размытым» переходом окраски индикатора и присутствием других веществ с окислительно-восстановительными свойствами, поэтому в связи с недостаточной селективностью титриметрической методики, для последующего исследования по изменению содержания витамина С в процессе хранения и его высвобождению был использован метод ВЭЖХ.

1.2. Изучение изменения содержания аскорбиновой кислоты в процессе хранения

С целью изучения динамики изменения содержания витамина С в процессе хранения в исследуемых препаратах нами был использован метод «ускоренного старения». Для этого препараты термостатировали в закрытых склянках темного стекла при 40°C в течение 48 суток. Определяли содержание витамина С на 12, 24, 36 и 48 сутки (в соответствии с методикой «Инструкция по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе метода «ускоренного старения» при повышенной температуре (И 42-2-82)»).

Результаты количественного определения витамина С в исследуемых препаратах в процессе хранения представлены в таблице 2 и на рисунке 1.

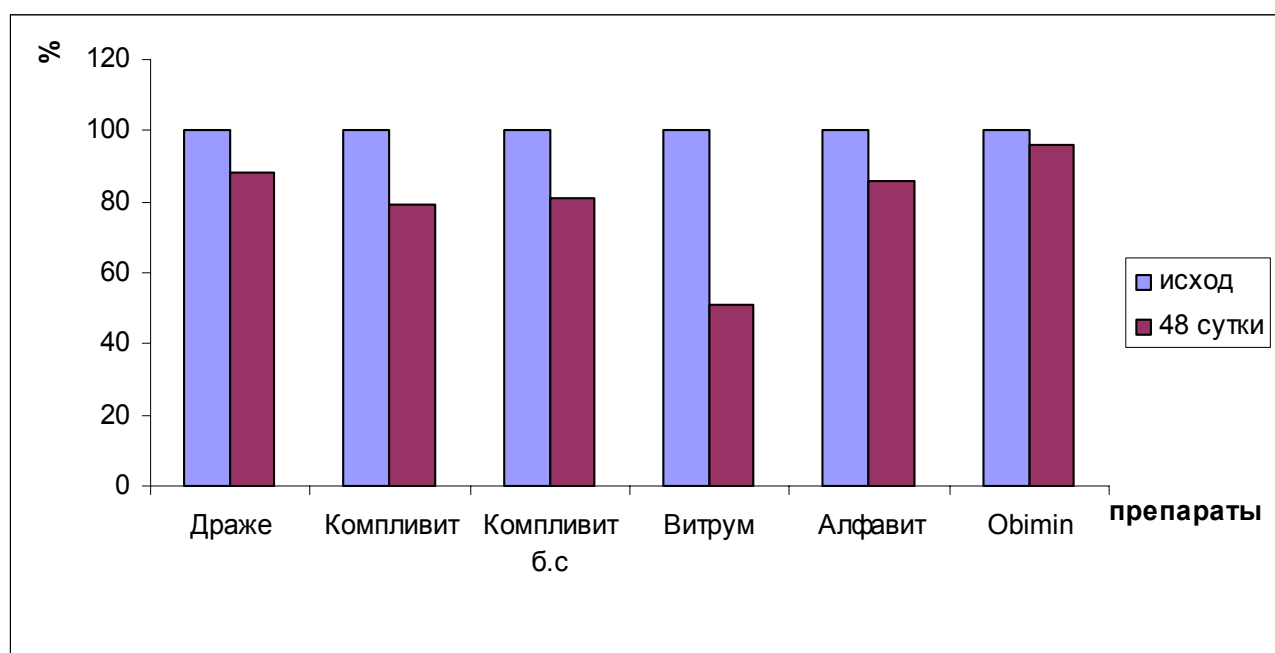


Рис.1. Изменение содержания витамина С в исследуемых препаратах в процессе хранения.

Таблица 2

Среднее содержание витамина С в исследуемых препаратах

Препараты	Содержание витамина С заявленное в препарате, мг	Срок хранения (сутки)				
		Исходное содержание витамина С	12	24	36	48
Драже аскорбиновой кислоты	50,00	51,96 мг ± 2,08	51,33 мг ± 2,34	49,75 мг ± 2,90	49,55 мг ± 2,98	45,79 мг ± 7,05
		103,92 %	102,66 %	99,50 %	99,10 %	91,58 %
Компливит	50,00	40,95 мг ± 2,05	38,75 мг ± 0,78	34,34* мг ± 5,29	31,26* мг ± 5,83	30,38* мг ± 3,13
		81,90 %	77,50 %	68,68 %	62,52 %	60,76 %
Компливит с пониженным содержанием сахара	50,00	46,27 мг ± 4,10	39,02 мг ± 1,12	36,99* мг ± 3,13	36,55* мг ± 3,34	36,54* мг ± 2,56
		92,54 %	78,04 %	73,98 %	73,10 %	73,08 %
Витрум	60,00	54,94 мг ± 4,96	44,00* мг ± 5,09	35,40* мг ± 4,04	29,34* мг ± 4,19	25,36* мг ± 4,33
		91,56 %	73,33 %	59,00 %	48,90 %	42,28 %
Алфавит	80,00	74,00 мг ± 1,07	71,88 мг ± 1,31	69,00* мг ± 1,47	68,96* мг ± 1,61	62,69* мг ± 2,06
		92,46 %	89,85 %	86,25 %	86,23 %	78,37 %
Obimin	100,00	104,79 мг ± 0,94	103,74 мг ± 0,83	102,15 мг ± 4,09	102,15 мг ± 4,28	101,27 мг ± 4,41
		104,79 %	103,74 %	102,15 %	102,15 %	101,27 %

*различия достоверны ($p < 0,05$) по отношению к исходному уровню

Как следует из представленных данных, в течение заявленного срока хранения (2 года, что соответствует 48 суткам «ускоренного старения») содержание витамина С в препаратах «Драже аскорбиновой кислоты» и «Obimin» статистически достоверно не отличается от исходного уровня, что характеризует их наибольшую стабильность в процессе хранения.

Наибольшее снижение содержания витамина С зарегистрировано у препарата «Витрум», статистически достоверное снижение отмечено уже на 12 сутки хранения. У «Компливита», «Компливита с пониженным содержанием сахара» и «Алфавита» статистически достоверное снижение отмечено на 24 сутки.

2. Сравнительное изучение изменения высвобождения аскорбиновой кислоты из мультивитаминных комплексов в процессе хранения

Параллельно с определением содержания аскорбиновой кислоты в препаратах в процессе хранения, нами проводилось изучение динамики ее высвобождения в условиях «теста растворение».

2.1. Условия эксперимента

В сосуд аппарата «Вращающаяся корзинка» помещали 500 мл среды (очищенная вода для "Драже" и "Витрум", HCl 0,1 М для "Компливит", "Компливит с пониженным содержанием сахара" и "Obimin"), которую термостатировали при 37°C.

В сухую корзинку аппарата «Вращающаяся корзинка» помещали одну таблетку исследуемого поливитаминного препарата. Корзинку опускали в сосуд со средой растворения так, чтобы до дна сосуда было 20 ± 2 мм и включали аппарат. Корзинка вращалась со скоростью 100 об/ мин.

Через 10, 15, 20, 30, 45 и 60 минут пипеткой отбирали 15 мл пробы в средней зоне на расстоянии не менее 1 см от внутренней стенки сосуда, фильтровали через бумажный фильтр «синяя лента», отбрасывая первые порции фильтрата и определяли количество витамина С,

высвобождающегося из лекарственной формы методом ВЭЖХ с УФ-детектированием как описано в разделе 1.1. Испытание проводили на 6 единицах лекарственной формы.

2.2. Результаты изучения высвобождения аскорбиновой кислоты в процессе хранения

Ниже представлены результаты динамики высвобождения витамина С в % из препаратов «Драже аскорбиновой кислоты», «Компливит», «Компливит с пониженным содержанием сахара», «Витрум» и «Obimin» после проведения теста «Растворение».

Из приведенных данных видно, что профиль высвобождения витамина С из моновитаминного препарата («Драже аскорбиновой кислоты») и витаминно-минеральных комплексов («Компливит», «Компливит с пониженным содержанием сахара», «Витрум» и «Obimin») различен. Скорость и степень высвобождения витамина С из монопрепарата практически не изменяется в процессе хранения. При этом профиль из монопрепарата характеризуется практически полным высвобождением в течение 10 минут, а затем наблюдается его снижение, что показывает неустойчивость аскорбиновой кислоты в водных растворах.

Высвобождение витамина С из витаминно-минеральных комплексов характеризуется большим разбросом, неустойчивым профилем и замедленным по сравнению с монопрепаратом профилем.

Следует отметить тот факт, что из витаминно-минерального комплекса «Алфавит» высвобождения витамина С в изучаемых условиях обнаружить не удалось.

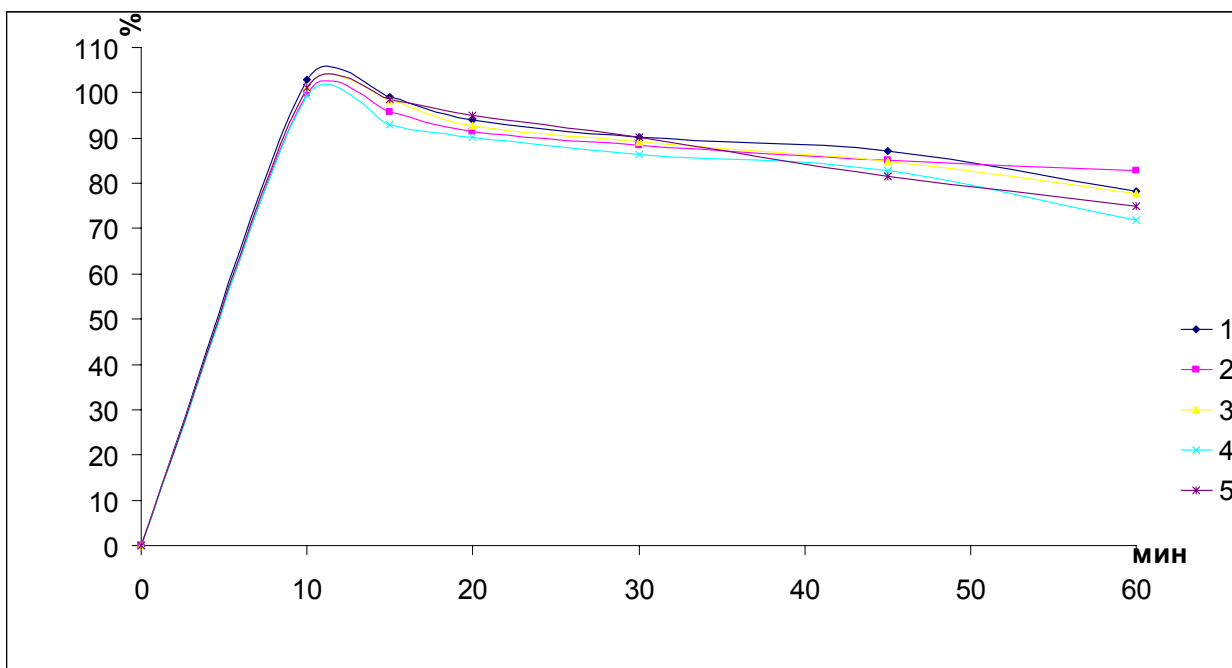


Рис.2. Высвобождение витамина С из «Драже аскорбиновой кислоты» в процессе хранения.

1—исход; 2—12 суток; 3—24 суток; 4—36 суток; 5—48 суток

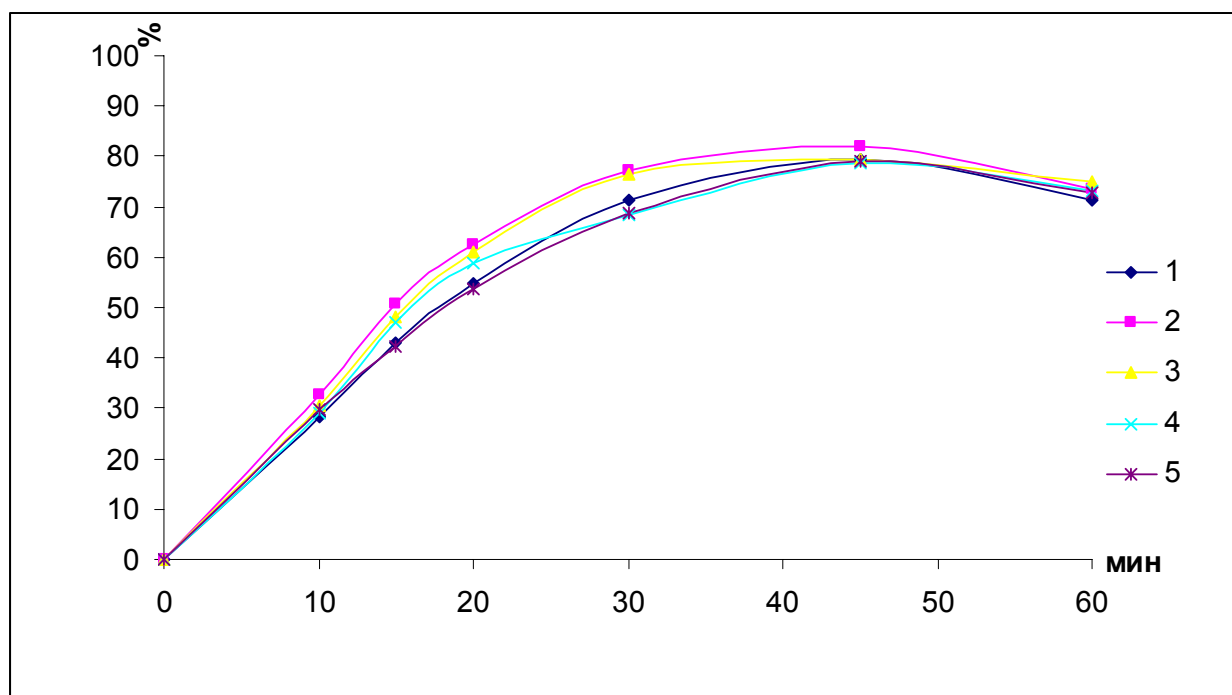


Рис.3. Высвобождение витамина С из «Компливит с пониженным содержанием сахара» в процессе хранения.

1—исход; 2—12 суток; 3—24 суток; 4—36 суток; 5—48 суток

Высвобождение витамина С из исследуемых препаратов, %

Название препарата	Срок (сутки)	Время (минуты)					
		10 %	15 %	20 %	30 %	45 %	60 %
Драже аскорбиновой кислоты	Исход	102,88±4,91	99,07±4,12	93,93±4,47	90,11±3,82	87,18±6,33	78,22±6,70
	12	99,83±9,02	95,81±10,12	91,35±9,48	88,40±8,63	85,12±8,77	82,76±9,71
	24	101,01±3,04	98,26±4,19	92,61±3,22	89,05±3,14	84,86±2,62	77,82±5,20
	36	99,21±7,76	92,95±5,93	90,29±5,18	86,49±2,46	82,83±2,12	71,96±3,51
	48	101,15±4,51	98,65±5,59	94,91±5,90	90,26±5,66	81,66±7,38	74,97±6,96
Компливит	Исход	3,37±0,91	3,37±0,91	8,95±3,43	60,03±33,96	76,46±6,33	67,22±3,90
	12	3,08±0,50	4,25±0,91	9,03±2,50	35,11±29,51	78,32±15,76	73,06±16,79
	24	2,79±0,91	3,67±0,69	6,82±2,93	36,48±26,44	75,44±5,31	68,70±5,68
	36	3,23±0,47	6,02±2,51	22,94±16,42	52,04±22,78	76,47±9,38	70,43±9,12
	48	3,67±0,69	5,64±2,26	15,99±12,56	68,16±9,58	76,76±6,46	71,44±3,41
Компливит с пониженным содержанием сахара	Исход	28,32±1,97	42,85±1,72	54,74±3,43	71,18±4,50	79,54±2,78	71,47±2,58
	12	32,87±4,40	50,75±7,62	62,52±6,24	77,37±4,70	81,89±2,27	73,56±1,87
	24	30,67±0,69	47,99±3,54	60,90±2,51	76,32±1,72	79,54±3,34	74,94±1,95
	36	28,91±3,27	47,19±4,40	58,76±3,82	68,39±12,61	78,81±2,73	72,98±3,74
	48	29,94±1,02	42,12±0,91	53,60±4,40	68,68±6,56	78,96±5,66	72,64±0,50
Витрум	Исход	21,40±5,05	34,12±3,11	41,83±2,53	53,32±5,06	60,79±6,63	59,19±8,60
	12	23,99±1,07	43,04±1,16	55,17±2,11	74,39±1,19	83,90±5,17	80,27±2,20
	24	16,73±1,33	28,47±2,72	36,75±4,50	51,98±6,12	62,84±7,06	55,40±5,68
	36	17,86±1,98	31,92±2,11	41,17±1,04	50,78±1,85	62,50±8,44	59,90±5,26
	48	15,77±3,87	29,97±2,50	43,19±9,88	48,92±5,98	58,22±10,78	55,44±11,11
	Исход	11,32±	29,43±	50,10±	79,18±	103,98±	99,31±6,

		3,01	5,27	8,51	6,51	1,66	04
Obimin	12	13,17± 2,04	27,15± 5,12	46,25± 3,27	83,74± 5,81	103,39± 2,47	99,14±3, 47
	24	11,79± 2,89	28,99± 5,00	50,45± 4,69	82,40± 6,43	103,59± 1,25	101,17± 1,46
	36	14,22± 3,35	35,18± 2,90	77,49± 0,91	95,01± 0,54	104,89± 1,43	102,48± 1,75
	48	16,79 ±1,28	42,32± 1,12	66,39± 2,44	101,87± 1,19	104,46± 0,90	102,25± 1,20

3. Фармакокинетическое исследование аскорбиновой кислоты

3.1. Ход исследования и методы количественного определения

Оценку витаминного статуса проводили у 10 здоровых добровольцев после приема препаратов "Драже аскорбиновой кислоты" и "Компливит". В исследование не включались добровольцы, которые в течение последнего месяца перед началом исследования применяли поливитаминные препараты. Также добровольцы должны были в течение эксперимента воздерживаться от употребления продуктов богатых витамином С (цитрусовые и другие).

В ходе исследования группа добровольцев получала препарат "Драже аскорбиновой кислоты", через неделю эта же группа добровольцев получала препарат "Компливит". Прием препарата осуществлялся per os однократно в 8 часов утра. Доза витамина С при проведении фармакокинетического исследования составила 50 мг. Забор крови натощак из кубитальной вены 5 мл в стеклянные пробирки производили непосредственно перед введением препарата и через 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 и 6 часов. Полученную после центрифугирования плазму хранили при температуре -35°C.

Определение витамина С в плазме крови по Фармеру и Эйбт

Образцы крови объемом в количестве не менее 0,5 мл отбирали в центрифужную пробирку, стенки которой смочены гепарином. После забора кровь в пробирке перемешивали и затем центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Полученную плазму осторожно отбирали пипеткой. В

центрифужную пробирку помещали 0,2 мл плазмы, 0,2 мл дистиллированной воды и 0,4 мл 5% метафосфорной кислоты для осаждения белков. Содержимое пробирки перемешивали на шейкере 1 минуту и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин. 0,2 мл центрифугата переносили в титрационные кюветы и титровали 0,0005 М раствора реактива Тильманса (исходный раствор реактива разбавляли в 2 раза дистиллированной водой непосредственно перед титрованием) до слабозимовой окраски. Параллельно проводили контрольное титрование, заменяя плазму крови на равный объем дистиллированной воды.

Предел обнаружения витамина С в плазме составлял 200 нг/мл.

Определение витамина С в плазме крови методом ВЭЖХ

Свежеотобранную кровь выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре и центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин при температуре 4°C. 50 мкл плазмы разводили 5 мкл раствора DPQ и добавляли 0,1 мл 0,6 М ТХУ. Смесь выдерживали при 4°C в течение приблизительно 5 минут и потом центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут. К 50 мкл надосадочной жидкости последовательно добавляли 50 мкл 0,3 М Na₂CO₃ в 0,1 М ацетатном буфере (pH = 4,5) и 10 мкл раствора йода и выдерживали при комнатной температуре 10-20°C. Избыток йода компенсировали добавлением 10 мкл 50 мМ раствора тиосульфата натрия. К смеси добавляли 50 мкл DDB раствора и получившийся раствор нагревали до 37°C в течение 30 минут в темноте. Реакционную смесь (10 мкл) вводили в хроматограф.

Хроматографический анализ.

По 10 мкл анализируемых проб и стандартных растворов вводили в хроматографическую систему. Анализ проводился с использованием флюориметрического детектора при длине волны возбуждения 371 нм и эмиссии 458 нм и скорости потока подвижной фазы (метанол: вода в

соотношении 50: 50) 1,2 мл/мин. В таких условиях время удерживания аскорбиновой кислоты составляло 2,7 мин.

Калибровочный график строили по этой же методике, за исключением того, что 0,1 мл раствора ТХУ заменяли раствором, содержащим аскорбиновую кислоту. Предел обнаружения аскорбиновой кислоты в плазме составлял 810 нг/мл.

Не смотря на то, что предел обнаружения меньше в методе титрования нами для фармакокинетического исследования был выбран метод ВЭЖХ, так как метод титрования по Фармеру и Эйбт более трудоемкий, длительный и затратный.

3.2. Результаты фармакокинетического исследования аскорбиновой кислоты

Результаты исследования фармакокинетики витамина С в плазме крови добровольцев приведены в таблице 4 и на рисунке 4.

Таблица 4

Динамика концентрации витамина С в плазме крови добровольцев (мкг/мл)

Время забора проб (час)	"Драже аскорбиновой кислоты"	"Компливит"
исход	6,4±2,6	7,2±1,8
0,5	15,7±5,2	10,7±2,6
1	20,3±5,1	13,3±3,0
1,5	25,3±4,8	15,3±1,9
2	28,5±6,4	10,8±4,2
3	21,3±4,9	7,9±2,8
4	15,7±2,5	5,1±1,4
5	11,2±1,8	4,3±1,2
6	7,9±1,3	3,7±1,2

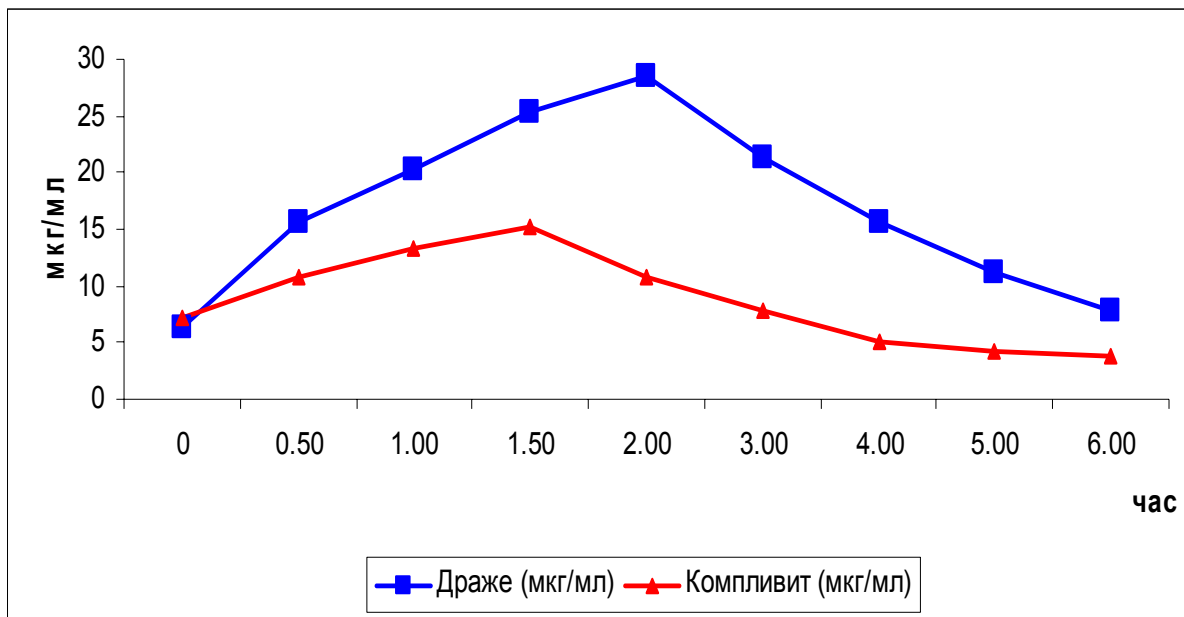


Рис.4. Динамика концентрации витамина С в плазме крови добровольцев.

Как следует из результатов, представленных в таблице 4, после приема препарата «Компливит» уже через полчаса концентрация витамина С в плазме крови возрастает до $10,7 \pm 2,6$ мкг/мл и достигает своего максимума к 1,5 час, составляя $15,3 \pm 1,9$ мкг/мл. В последующие точки забора концентрация витамина в крови постепенно снижается и к 6 часам равна $3,7 \pm 1,2$ мкг/мл.

Динамика концентрации витамина С в плазме крови после приема «Драже аскорбиновой кислоты» статистически достоверно отличается от препарата «Компливит». Уже через полчаса концентрация увеличивается до $15,7 \pm 5,2$ мкг/мл и продолжает нарастать ко 2-му часу до $28,5 \pm 6,4$ мкг/мл.

Таким образом, проведенное исследование по изменению содержания, высвобождению и фармакокинетики комплексно показывает, что применение витаминно-минеральных комплексов целесообразно только для профилактики авитаминозов, а для лечения необходимо использовать витамин С в виде монопрепарата.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Для количественной оценки аскорбиновой кислоты в мультивитаминных препаратах, а также при проведении фармакокинетических исследований наиболее оптимальным является метод ВЭЖХ.
2. Показано, что содержание аскорбиновой кислоты в мультивитаминных препаратах в процессе хранения снижается, что может быть обусловлено присутствием в препарате соединений, влияющих на окислительно-восстановительные свойства аскорбиновой кислоты. Содержание витамина С в препаратах «Драже аскорбиновой кислоты» и «Obimin» в процессе хранения статистически достоверно не отличается от исходного уровня, что характеризует их наибольшую стабильность в процессе хранения по сравнению с витаминно-минеральными комплексами.
3. Установлены степень и скорость высвобождения витамина С из мультивитаминных препаратов в процессе хранения по тесту "Растворение".
4. Показано, что сочетание разнообразных витаминов и макро-и микроэлементов в поливитаминно- минеральных комплексах приводит к уменьшению высвобождения входящего в него витамина С по сравнению с монопрепаратом.
5. При приеме в одинаковой дозе уровни концентрации достоверно выше после введения витамина С в виде монопрепарата. Применение мультивитаминных комплексов позволяет корректировать уровень витамина С и может применяться для профилактики авитаминоза. Для лечения необходимо использовать монопрепарат.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Современные представления о взаимодействии витаминов / Хюинь Тхи Хонг Гам, К.Е.Михновец, Г.В.Раменская, Н.П.Садчикова // Вопросы питания. —2009.-№4. —С.66-71.
2. Михновец К.Е., Хюинь Гам Т.Х., Василенко Г.Ф. Изучение изменения содержания аскорбиновой кислоты в мультивитаминных препаратах в процессе хранения // Тез. XVII Рос. нац. конгресса "Человек и лекарство". —М., 2010. —С.681.
3. Хюинь Тхи Хонг Гам. Сравнительные методы анализа аскорбиновой кислоты в мультивитаминно-минеральных комплексах // Микроэлементы в медицине.—2010.-Т.11.-Вып.3.- С.27-30.