

На правах рукописи

ПАНОВ АЛЕКСЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**РЕАКЦИЯ ГИДРОКСИЭТИЛИРОВАНИЯ
КАК МЕТОД ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ КРАХМАЛА**

Специальность 02.00.06 – высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва 2009

Работа выполнена в Российском химико-технологическом университете имени Д.И. Менделеева в УНЦ «Биоматериалы»

Научный консультант:

доктор химических наук,
профессор
Штильман Михаил Исаакович

Официальные оппоненты:

член-корреспондент РАН,
доктор химических наук, профессор
Зезин Александр Борисович

член-корреспондент РАН,
доктор технических наук, профессор
Береговых Валерий Васильевич

Ведущая организация:

Институт элементоорганических соединений им. А.Н.

Несмеянова РАН

Защита состоится “ **26** ” **ноября 2009** г. в **16-30** часов на заседании Диссертационного Совета Д 212.120.04 в Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова по адресу:
119571, г. Москва, пр. Вернадского, д.86, корп. Т, ауд.Т-410

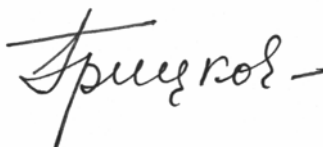
Отзывы на автореферат направлять по адресу:

119571, г. Москва, пр. Вернадского, д.86, МИТХТ, им. М.В. Ломоносова.

С диссертацией можно ознакомиться на сайте www.mitht.ru и в библиотеке МИТХТ им. М.В. Ломоносова

Автореферат размещен на сайте « 26 » октября 2009 г.
и разослан « 26 » октября 2009 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета Д 212.120.04,
доктор химических наук, профессор



И.А. Грицкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Макромолекулярные системы занимают важное место среди современных лекарственных препаратов. В том числе, это относится к полимерным компонентам кровезаменителей различного типа, в частности, производным полисахаридов, сочетающим высокую эффективность и безвредность за счет постепенного распада в организме с последующим выведением образовавшихся фрагментов.

К таким полимерам относится гидроксиэтилированный крахмал, составляющий основу плазмозамещающих кровезаменителей, широко применяемых в медицине катастроф, хирургии, акушерстве и гинекологии, а также в качестве криопротекторных составов, используемых при хранении трансплантируемых органов.

В настоящее время в Российской Федерации отсутствует производство гидроксиэтилированного крахмала. В связи с этим, работы, направленные на изучение реакции гидроксиэтилирования крахмала различного происхождения с целью создания отечественной фармацевтической субстанции являются **актуальными**.

Цель работы: изучение закономерностей реакции гидроксиэтилирования амилопектинового крахмала для получения фармацевтической субстанции гидроксиэтилированного крахмала из доступного отечественного сырья.

Научная новизна – определены оптимальные условия реакции гидроксиэтилирования крахмала различного происхождения: концентрация крахмала, температура процесса, концентрация и природа катализатора, мольное соотношение крахмал : алкилирующий агент.

Для прогнозирования свойств субстанции разработан математический аппарат конформационного анализа макромолекул олиго- и полисахаридов.

Предложен новый подход к количественной оценке степени превращения реагентов и их селективности в реакции гидроксиэтилирования крахмала на основе ЯМР ^{13}C спектроскопии.

Разработан комплексный метод анализа тонкой структуры амилопектина и его гидроксиэтильных производных, пригодный для стандартизации лекарственных препаратов на основе гидроксиэтилированного крахмала.

Практическая значимость работы.

Разработана оригинальная технология получения фармацевтической субстанции гидроксиэтилированного крахмала из доступного отечественного сырья. Разработан метод оперативного производственного контроля, а также комплексный метод анализа структуры

амилопектина и его гидроксиэтильных производных, пригодный для стандартизации лекарственных препаратов на основе гидроксиэтилированного крахмала.

Автор защищает:

1. Результаты оптимизации условий реакции гидроксиэтилирования крахмала.
2. Метод контроля за протеканием реакции гидроксиэтилирования полисахаридов на основе ЯМР ^{13}C спектроскопии.
3. Новый метод исследования тонкой структуры молекул гидроксиэтилированного крахмала.
4. Метод конформационного анализа макромолекул олиго- и полисахаридов.
5. Технологию получения субстанции гидроксиэтилированного крахмала.

Личное участие состояло в создании лабораторной установки гидроксиэтилирования, непосредственном анализе химического строения полисахаридов и продуктов их модификации методом ^{13}C ЯМР, подготовке проб для анализа строения гидроксиэтилированного крахмала методом ГЖХ, оптимизации условий гидроксиэтилирования крахмала, разработке математического аппарата конформационного анализа полисахаридов, интерпретации результатов исследований, подготовке докладов и публикаций.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались и обсуждались на следующих российских и международных конференциях и симпозиумах:

- V Съезд гематологов и трансфузиологов республики Беларусь «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии. (Минск, 2003);
- Съезд международной инженерной академии (Париж, 2004);
- Международная конференция "Биотехнология и Медицина" Москва, 2006);
- Международная конференция "Органическая химия от Бутлерова и Бельштейна до современности" (Санкт-Петербург, 2006);

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованном ВАК, 1 патент РФ, а также 4 тезиса докладов, представленных на отечественных и международных конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, шести глав, выводов и списка литературы (173 наименования). Работа изложена на 152 страницах, включая 46 рисунков и 36 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении сформулированы цель работы, актуальность проблемы, основные положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость работы.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

В первой главе дан подробный анализ публикаций, посвященных химической модификации крахмала, изучению строения полисахаридов и их применению в медицине.

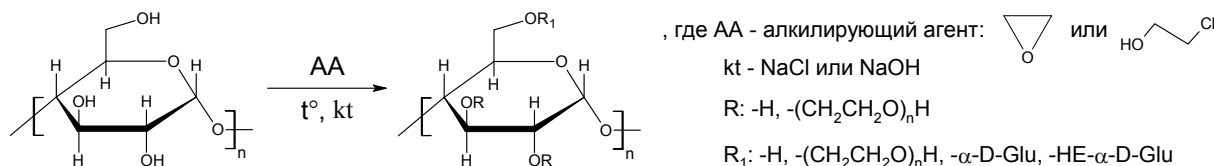
ГЛАВА 2. В Экспериментальной части охарактеризованы объекты исследования, приведены методики синтеза и анализа исследуемых полисахаридов, дано описание экспериментальной установки.

ГЛАВА 3. Результаты и их обсуждение

3.1 Основные стадии синтеза гидроксиэтилированного крахмала (ГЭК)

Поскольку в качестве сырья для получения ГЭК медицинского назначения принято использовать только крахмал с высоким (не менее 95%) содержанием амилопектина, в диссертации был разработан метод очистки пищевого крахмала с низким содержанием амилопектина (ГОСТ 7699-78), который предусматривает его кислотный гидролиз и последующее отделение амилозы. Разработанный метод позволяет получать крахмалы с требуемым содержанием амилопектина и необходимой величиной молекулярной массы. Также был разработан метод кислотного гидролиза сортов крахмала с высоким содержанием амилопектина («Mazaca 3401X», произв. Penford, Австралия; «Inovatex 100», произв. Avebe, Голландия), которые обычно применяются для получения субстанции ГЭК.

Из известных способов проведения реакции гидроксиэтилирования полисахаридов нами выбран процесс, предусматривающий проведение реакции в водном растворе в присутствии хлорида или гидроксида натрия. В качестве алкилирующих агентов (АА) были использованы этиленоксид (ЭО) и этиленхлоргидрин (ЭХГ).



3.2. Изучение реакции гидроксиэтилирования крахмала

3.2.1. Метод количественной оценки параметров реакции гидроксиэтилирования крахмала и характеристик полученных продуктов на основе спектроскопии ЯМР ¹³C

Для контроля за ходом протекания процесса гидроксиэтилирования был разработан комплексный метод анализа на основе спектроскопии ЯМР ¹³C. Данный метод позволяет с

достаточной точностью получать информацию как о качественном и количественном составе реакционной массы, так и о строении образующихся продуктов.

На рисунке 1 представлен типичный спектр ЯМР ^{13}C реакционной смеси, зарегистрированный с помощью процедуры Inverse Gate.

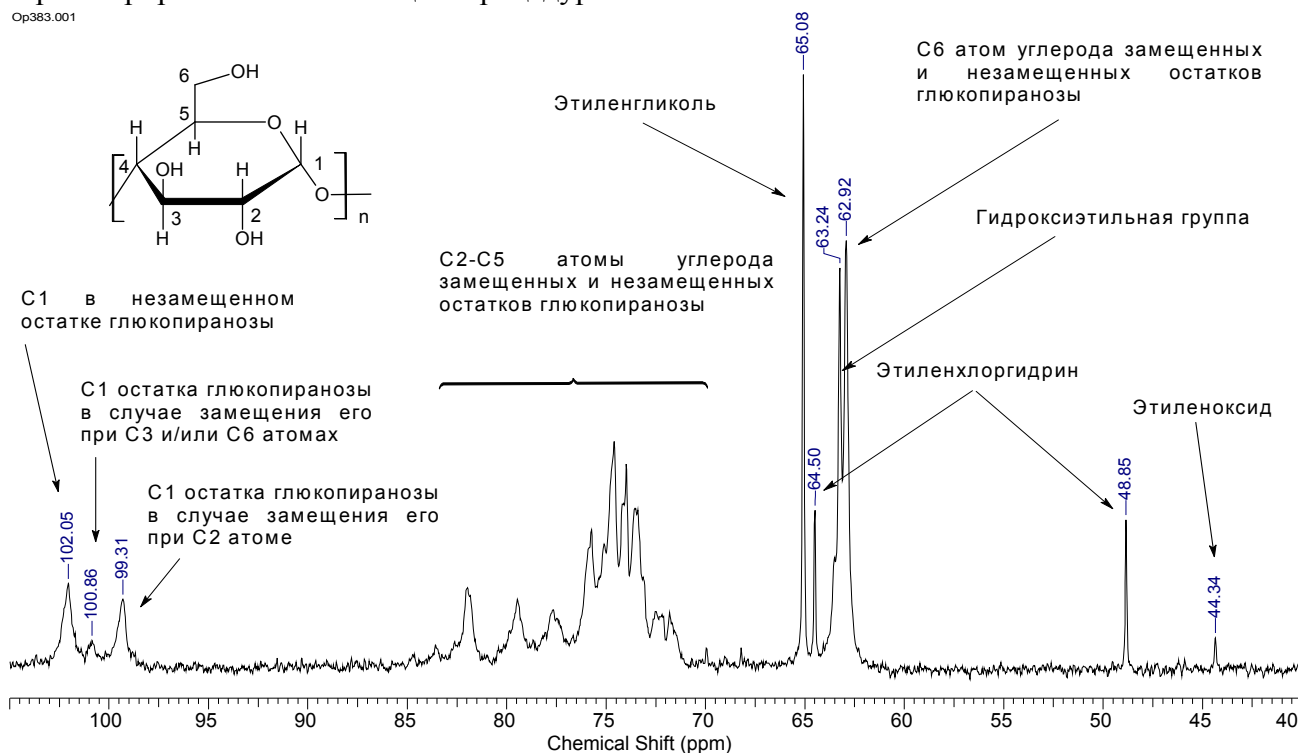


Рис.1. Типичный спектр ЯМР ^{13}C реакционной смеси.

Таблица 1

Отнесение сигналов в типичном спектре ЯМР ^{13}C реакционной смеси

№	Отнесение сигнала или группы сигналов	Обозначение	Химический сдвиг, м.д.
1	Сигнал ядер углерода этиленоксида (ЭО)	S1	44,34
2	Сигнал С2 атома углерода (С-Cl) этиленхлоргидрина (ЭХГ)	S2	48,85
3	Сигнал С6 атома углерода у замещенных и незамещенных остатков глюкопиранозы	S3	62,92; 63,50
4	Сигнал терминального атома углерода (CH ₂ -OH) гидроксиэтильной группы	S4	63,24
5	Сигнал С1 атома углерода этиленхлоргидрина (С-ОН)	S5	64,50
6	Сигнал ядер углерода этиленгликоля	S6	65,08
7	Группа сигналов атомов углерода С2-С5 замещенных и незамещенных остатков глюкопиранозы Сигнал атома углерода (С-ОСН ₂) гидроксиэтильной группы	S7	68,00-85,00
8	Сигнал атома углерода С1 глюкопиранозного остатка в случае его замещения при С2 атоме	S8	99,31
9	Сигнал атома углерода С1 глюкопиранозного остатка в случае его замещения при С3 и/или С6 атомах	S9	100,86
10	Сигнал атома углерода С1 в незамещенном остатке глюкопиранозы	S10	102,05

Основные характеристики полученных продуктов (СЗ и молярное замещение (МЗ)) и параметры реакции гидроксиэтилирования полисахаридов (селективность ($\Phi_{AA}^{ГЭК}$) и степень превращения (X_{AA}) алкилирующего агента) определяли по формулам 1-6:

$$CЗ = \frac{I_{S8} + I_{S9}}{I_{S8} + I_{S9} + I_{S10}} \quad (1)$$

$$MЗ = \frac{I_{S4}}{I_{S8} + I_{S9} + I_{S10}} \quad (2)$$

$$X_{ЭО} = \frac{I_{S8} + I_{S9} + \frac{I_{S6}}{2}}{I_{S1}/2 + \frac{I_{S6}}{2} + I_{S8} + I_{S9}} \quad (3)$$

$$\Phi_{ЭО}^{ГЭК} = \frac{I_{S8} + I_{S9}}{I_{S8} + I_{S9} + \frac{I_{S6}}{2}} \quad (4)$$

$$X_{ЭХГ} = \frac{I_{S8} + I_{S9} + \frac{I_{S1}}{2} + \frac{I_{S6}}{2}}{I_{S1}/2 + I_{S2} + \frac{I_{S6}}{2} + I_{S8} + I_{S9}} \quad (5)$$

$$\Phi_{ЭХГ}^{ГЭК} = \frac{I_{S8} + I_{S9}}{I_{S8} + I_{S9} + \frac{I_{S1}}{2} + \frac{I_{S6}}{2}} \quad (6)$$

где I_{Si} – интегральная интенсивность сигнала S_i (см. таблицу 1).

Следует отметить, что важным показателем ГЭК, используемого в качестве фармацевтической субстанции, является цветность. Как известно, в процессе гидроксиэтилирования образуются окрашенные побочные продукты. Несмотря на дальнейшую обработку реакционной массы в процессе ультрафильтрации и кипячения с активированным углем, не удается полностью избавиться от окраски раствора ГЭК. Данный факт дает основания для предположения, что в процессе гидроксиэтилирования кроме образования низкомолекулярных окрашенных продуктов, также происходит частичная модификация самого крахмала. В виду невозможности полной очистки ГЭК от окрашенных продуктов, при проведении процесса гидроксиэтилирования наряду с вышеуказанными характеристиками реакции необходимо оценивать степень окрашивания реакционной массы. В качестве критерия для количественной оценки величины цветности ГЭК можно использовать величину удельной оптической плотности:

$$A_{уд} = \frac{A_{400} \cdot 100\%}{C_K}, \quad (7)$$

A_{400} – оптическая плотность
 нейтрализованной реакционной массы,
 измеренная при длине волны 400 нм;
 C_K – концентрация крахмала, масс. %.

3.2.2. Влияние отдельных факторов на реакцию гидроксиэтилирования крахмала

3.2.2.1. Гидроксиэтилирование крахмала этиленоксидом (ЭО) в присутствии NaCl

Для определения оптимальной концентрации крахмала была проведена серия экспериментов с различным его содержанием в растворе: 15, 21 и 27%. Методом

спектрофотометрии и ЯМР ^{13}C спектроскопии проводили анализ полученных образцов. Как видно из рис.2, рост СЗ сопровождается значительным ростом $A_{\text{уд}}$. С другой стороны, при концентрации крахмала 15% наблюдается низкая селективность этиленоксида по основному продукту, а также остаточное количество этиленоксида (5%) в реакционной массе. Для дальнейших исследований выбрана концентрация крахмала – 21%.

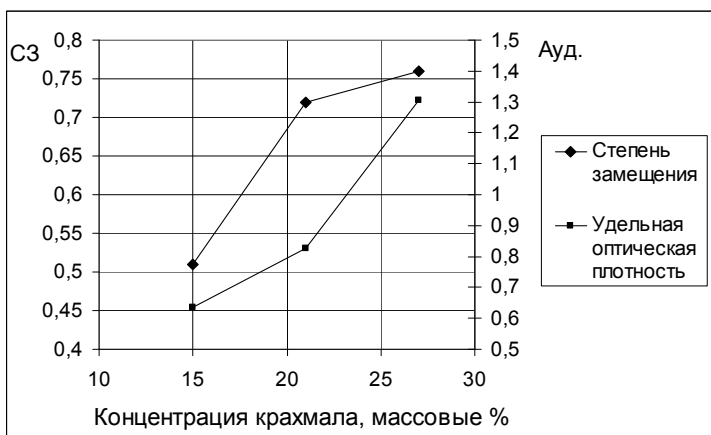


Рис.2. Зависимость СЗ и удельной оптической плотности от концентрации крахмала.

Наиболее доступным, безопасным и мягким катализатором является хлорид натрия. С целью определения оптимальной концентрации катализатора была проведена серия экспериментов по гидроксиэтилированию крахмала избытком ЭО при оптимальной концентрации крахмала (21%).

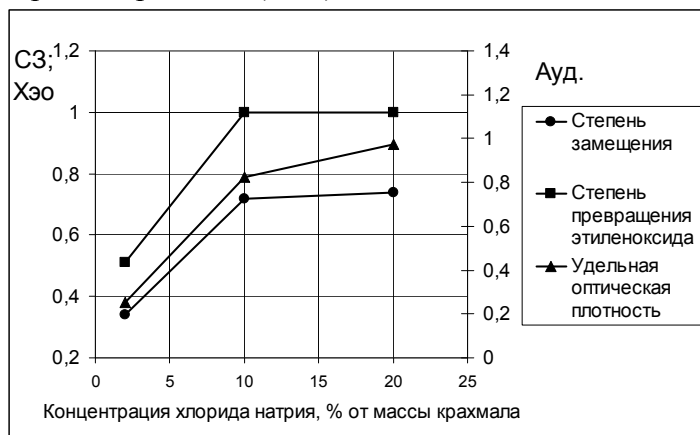


Рис.3. Зависимость СЗ, степени превращения этиленоксида и удельной оптической плотности от концентрации хлорида натрия

При концентрации катализатора 2%, наблюдается очень низкая степень превращения, как исходного соединения, так и этиленоксида (рис.3). При концентрациях хлорида натрия 10 и 20% степени превращения имеют близкие значения, но $A_{\text{уд}}$ в последнем случае более интенсивна. По этой причине, оптимальное значение концентрации хлорида натрия 10%.

Для определения оптимального значения температуры, при которой необходимо проводить реакцию гидроксиэтилирования крахмала этиленоксидом была проведена серия экспериментов с различными температурами (30, 40, 50 и 70°C) при оптимальной концентрации крахмала 21% (рис.4).

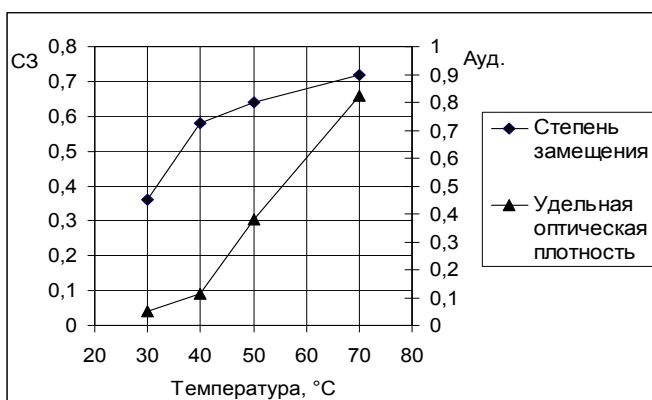


Рис.4. Зависимость СЗ и удельной оптической плотности от температуры.

Значительный рост СЗ наблюдается вплоть до 40°С, который постепенно замедляется. В тоже время, выше 40°С происходит сильное увеличение А_{уд.} Таким образом, при гидроксиэтилировании крахмала этиленоксидом в присутствии хлорида натрия, 40°С является оптимальной температурой для проведения реакции.

Таблица 2

Характеристики процесса и продуктов реакции при различных соотношениях крахмал/ЭО

№	Шифр образца	Температура реакции Т, °С	Соотношение реагентов N _{ИС} : N _{ЭО}	Время с начала подачи ЭО, ч	СЗ = X _{ИС}	МЗ	X _{ЭО}	Φ ^{ГЭК} _{ЭО}	A _{уд}
1	Образец 9.1	40	1 : 0,70	2	0,18	0,20	0,32	0,94	0,003
2	Образец 9.2			4	0,30	0,34	0,63	0,88	0,014
3	Образец 9.3			8	0,39	0,45	0,86	0,81	0,058
4	Образец 9.4			16	0,42	0,50	0,98	0,77	0,071
5	Образец 9.5			24	0,43	0,52	1,00	0,76	0,146
6	Образец 10.1		1 : 1,00	2	0,24	0,27	0,33	0,92	0,016
7	Образец 10.2			4	0,37	0,43	0,49	0,90	0,064
8	Образец 10.3			8	0,46	0,55	0,71	0,82	0,108
9	Образец 10.4			16	0,51	0,61	0,91	0,72	0,155
10	Образец 10.5			24	0,53	0,64	1,00	0,71	0,218
11	Образец 11.1		1 : 1,60	2	0,32	0,37	0,27	0,90	0,035
12	Образец 11.2			4	0,51	0,61	0,50	0,82	0,098
13	Образец 11.3			8	0,65	0,78	0,73	0,72	0,167
14	Образец 11.4			16	0,71	0,89	0,92	0,64	0,236
15	Образец 11.5			24	0,73	0,92	0,99	0,64	0,301
16	Образец 12.1		1 : 2,20	2	0,38	0,45	0,30	0,74	0,047
17	Образец 12.2			4	0,64	0,78	0,62	0,64	0,102
18	Образец 12.3			8	0,79	1,02	0,79	0,62	0,214
19	Образец 12.4			16	0,85	1,15	0,90	0,61	0,338
20	Образец 12.5			24	0,87	1,21	0,97	0,60	0,479

Не менее существенное влияние на характеристики процесса гидроксиэтилирования оказывает соотношение реагентов – крахмал / ЭО. Для получения требуемых величин СЗ была проведена серия экспериментов при постоянных оптимальных условиях: концентрации крахмала 21%, концентрации NaCl 10%, и варьируемых количествах этиленоксида. Результаты представлены в таблице 2.

По данным таблицы 2 были построены графические зависимости величины СЗ от времени для различных соотношений крахмал/ЭО, при которых определены эффективные константы скоростей в предположении первого порядка реакции по крахмалу.

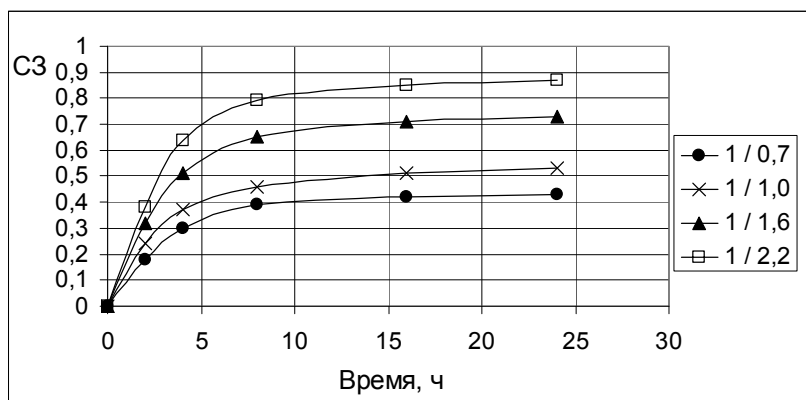


Рис.5. Зависимость СЗ от времени реакции при мольных соотношениях крахмал – этиленоксид: 1 / 0,7; 1 / 1,0; 1 / 1,6 и 1 / 2,2.

Полученные данные (рис.5) позволяют легко определить при каких условиях проведения процесса гидроксиэтилирования крахмала можно получить требуемую величину СЗ в диапазоне от 0,3 до 0,9. Воспроизводимые результаты при значительных изменениях времени отмечаются в области «плато» на графиках, которые целесообразно отбирать для величин СЗ (0,4, 0,5, 0,7), присущих фармацевтическим субстанциям.

Таким образом, для получения вышеуказанных степеней замещения ГЭК необходимо проводить процесс в условиях, описанных в таблице 3.

Таблица 3

Оптимальные условия получения ГЭК со СЗ 0,4, 0,5 и 0,7

№	Степень замещения	Температура реакции T, °С	Концентрация крахмала, % масс.	Концентрация NaCl, % масс.	Соотношение реагентов $N_{ис} : N_{эо}$	Время с начала подачи ЭО, ч
1	0,4	40	21	10	1 : 0,7	9,0
2	0,5				1 : 1,0	13,0
3	0,7				1 : 1,6	15,0

3.2.2.2. Гидроксиэтилирование крахмала этиленоксидом в присутствии NaOH

Для производства продукта фармацевтического назначения наиболее приемлемым является гидроксид натрия, поскольку образующийся при нейтрализации хлорид натрия в случае неполной очистки продукта не представляет серьезной опасности.

Для определения оптимальных условий реакции гидроксиэтилирования крахмала в присутствие гидроксида натрия был использован описанный ранее подход. Гидроксиэтилированию этиленоксидом при температуре 40°C подвергался щелочной раствор с концентрацией крахмала 21%, соотношением крахмал/ЭО 1:1, при различных концентрациях щелочи (рис.6).

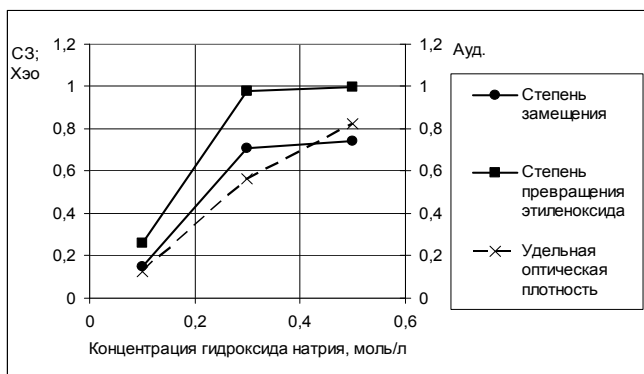


Рис. 6. Зависимость СЗ, степени превращения этиленоксида и удельной оптической плотности от концентрации гидроксида натрия.

При концентрации катализатора 0,1 М наблюдаются низкие значения основных показателей реакции. В диапазоне концентраций 0,3-0,5М при незначительном росте СЗ и степени превращения этиленоксида наблюдается рост удельной оптической плотности. На основании этих данных, для дальнейших экспериментов с этиленоксидом использована наиболее пригодная для получения ГЭК концентрация гидроксида натрия в щелочном растворе, равная 0,3 М.

Имеющиеся данные свидетельствуют, что при использовании в качестве катализатора гидроксида натрия наблюдается более интенсивное протекание реакции по сравнению с процессом гидроксиэтилирования в присутствии хлорида натрия. Ввиду этого, была проведена серия экспериментов при более низких температурах. Как видно из графиков, представленных на рис. 7, несмотря на невысокие значения $A_{уд}$ после гидроксиэтилирования при температуре 20°C, реакция характеризуется низкими степенями превращения. В диапазоне температур после 30°C не наблюдается существенного изменения степени конверсии как по крахмалу, так и по этиленоксиду. Однако, при температуре 30°C значительно ниже $A_{уд}$, чем при 40°C.

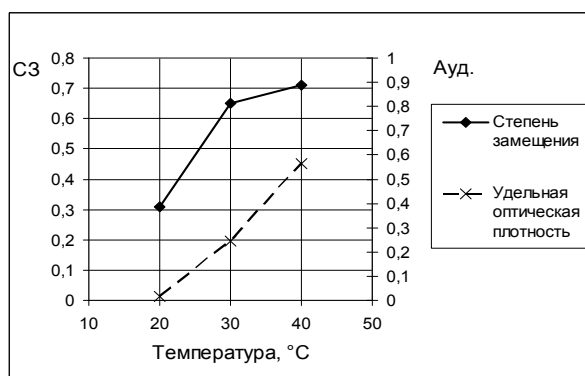


Рис. 7. Зависимость СЗ и удельной оптической плотности от температуры реакции гидроксиэтилирования

Последнее обстоятельство стало решающим для выбора условий реакции гидроксиэтилирования крахмала этиленоксидом при щелочном катализе. Таким образом, оптимальная температура в этих условиях составляет 30°C.

Для получения ГЭК с заданной СЗ была проведена серия экспериментов при фиксированных значениях оптимальных показателей: температуры, концентрации катализатора и крахмала, и варьируемых соотношениях крахмал/ЭО.

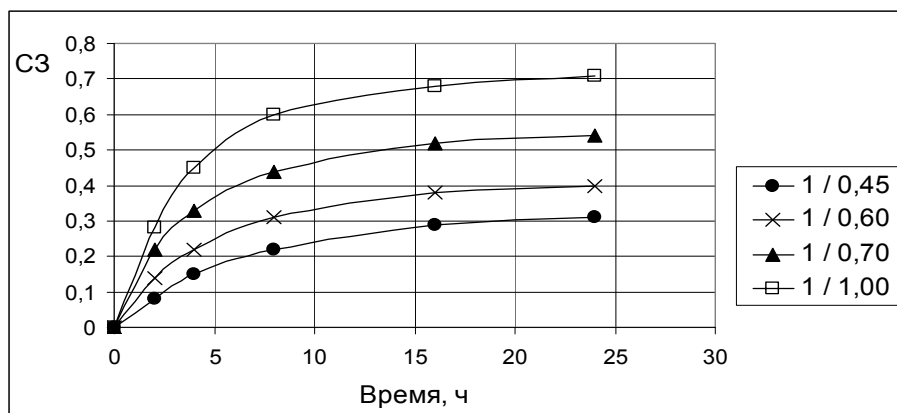


Рис.8. Зависимость степени замещения от соотношения крахмал/этиленоксид.

Таблица 4

Характеристики процесса и продуктов реакции при различных соотношениях крахмал/ЭО

№	Шифр образца	Температура реакции T, °C	Соотношение реагентов N _{ИС} : N _{ЭО}	Время с начала подачи ЭО, ч	СЗ = X _{ИС}	МЗ	X _{ЭО}	Φ ^{ГЭК} _{ЭО}	A _{уд}
1	Образец 18.1	30	1 : 0,45	2	0,08	0,10	0,24	0,98	0,038
2	Образец 18.2			4	0,15	0,18	0,44	0,96	0,061
3	Образец 18.3			8	0,22	0,30	0,72	0,95	0,099
4	Образец 18.4			16	0,29	0,40	0,99	0,94	0,120
5	Образец 18.5			24	0,31	0,42	1,00	0,94	0,145
6	Образец 19.1		1 : 0,60	2	0,14	0,18	0,32	0,98	0,051
7	Образец 19.2			4	0,22	0,29	0,53	0,96	0,089
8	Образец 19.3			8	0,31	0,42	0,76	0,95	0,123
9	Образец 19.4			16	0,38	0,52	0,97	0,94	0,158
10	Образец 19.5			24	0,40	0,55	1,00	0,94	0,192
11	Образец 20.1		1 : 0,70	2	0,22	0,28	0,42	0,98	0,065
12	Образец 20.2			4	0,33	0,40	0,60	0,97	0,143
13	Образец 20.3			8	0,44	0,54	0,83	0,96	0,174
14	Образец 20.4			16	0,52	0,64	0,97	0,95	0,202
15	Образец 20.5			24	0,54	0,66	1,00	0,95	0,223
16	Образец 21.1		1 : 1,00	2	0,28	0,37	0,41	0,97	0,078
17	Образец 21.2			4	0,45	0,53	0,58	0,95	0,196
18	Образец 21.3			8	0,60	0,71	0,80	0,92	0,220
19	Образец 21.4			16	0,68	0,82	0,95	0,90	0,242
20	Образец 21.5			24	0,71	0,85	1,00	0,90	0,264

Таблица 5

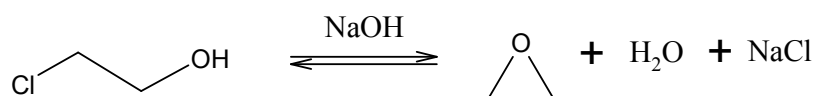
Оптимальные условия реакции получения ГЭК со СЗ 0,4, 0,5 и 0,7

№	Степень замещения	Температура реакции T, °C	Концентрация крахмала, % масс.	Концентрация NaOH, моль/л	Соотношение реагентов N _{ИС} : N _{ЭО}	Время с начала подачи ЭО, ч
1	0,4	30	21	0,3	1 : 0,6	20,0
2	0,5				1 : 0,7	13,0
3	0,7				1 : 1,0	21,0

На основании данных таблицы 4 и рис. 8 были определены оптимальные условия реакций синтеза ГЭК (СЗ 0,4, 0,5 и 0,7) (таблица 5), при которых получены эффективные константы скоростей в предположении первого порядка реакции по крахмалу.

3.2.2.3. Гидроксиэтилирование крахмала этиленхлоргидрином в присутствии NaOH

Использование в качестве алкилирующего агента (АА) этиленоксида сопряжено с рядом недостатков, которые отсутствуют при использовании этиленхлоргидрина (ЭХГ). Следует отметить, что в водном растворе в присутствии щелочного агента наблюдается равновесие между этиленхлоргидрином и этиленоксидом.



В этом случае ЭО образуется в реакторе *in situ*. В качестве щелочного агента выбран гидроксид натрия, как наиболее доступный и позволяющий создать необходимые условия для протекания реакции. С учетом расхода щелочного агента в реакции, возможно два способа проведения процесса. Прямой способ – дозирование ЭХГ в щелочной раствор крахмала. Обратный – дозирование раствора щелочи к смеси ЭХГ с крахмалом.

Для изучения процесса гидроксиэтилирования крахмала ЭХГ были воспроизведены условия, аналогичные реакции с ЭО в щелочной среде (разд.3.2.2.2): температура 30°C, концентрация крахмального клейстера 21% при прямом способе и 24% при обратном (таблица 6).

Из таблицы 6 видно, что степень замещения ГЭК в первую очередь зависит от количества щелочи в реакционной массе. При увеличении количества щелочного агента больше, чем указано в таблице, наблюдается значительный рост $A_{уд}$, при которой продукт, уже не может быть использован в качестве фармацевтической субстанции.

На основании данных таблицы 6 и рис.9 были определены условия реакций получения ГЭК со степенями замещения 0,4 и 0,5.

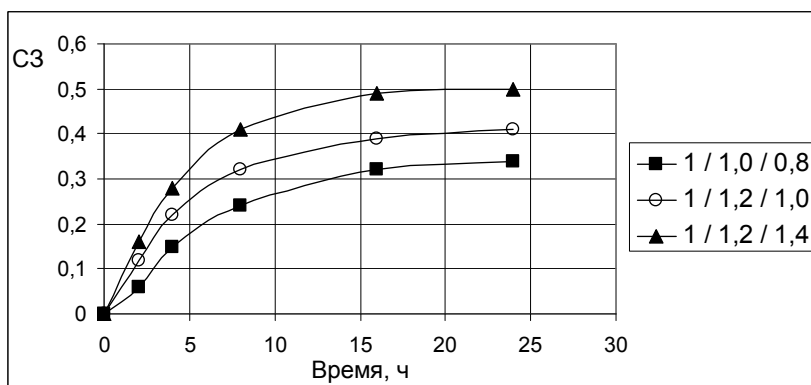


Рис. 9. Рост степени замещения во времени при прямом способе дозировки ЭХГ

Таблица 6

Характеристики процесса и продуктов реакции при различных соотношениях крахмал/ЭХГ/NaOH при прямом способе загрузки

№	Шифр образца	Температура реакции T, °C	Соотношение реагентов N _{ИС} :N _{ЭХГ} :N _{NaOH}	Время с начала подачи ЭХГ, ч	СЗ = X _{ИС}	МЗ	X _{ЭХГ}	Φ ^{ГЭК} _{ЭХГ}	A _{уд}
1	Образец 22.1	30	1 : 1,0 : 0,8	2	0,06	0,10	0,16	0,73	0,035
2	Образец 22.2			4	0,15	0,21	0,32	0,71	0,081
3	Образец 22.3			8	0,24	0,30	0,48	0,69	0,116
4	Образец 22.4			16	0,32	0,38	0,69	0,63	0,145
5	Образец 22.5			24	0,34	0,41	0,70	0,65	0,164
6	Образец 23.1		1 : 1,2 : 1,0	2	0,12	0,18	0,23	0,78	0,065
7	Образец 23.2			4	0,22	0,29	0,36	0,75	0,127
8	Образец 23.3			8	0,32	0,42	0,53	0,73	0,173
9	Образец 23.4			16	0,39	0,54	0,71	0,69	0,198
10	Образец 23.5			24	0,41	0,55	0,73	0,69	0,212
11	Образец 24.1		1 : 1,2 : 1,4	2	0,16	0,22	0,26	0,82	0,081
12	Образец 24.2			4	0,28	0,35	0,42	0,78	0,156
13	Образец 24.3			8	0,41	0,48	0,62	0,75	0,217
14	Образец 24.4			16	0,49	0,61	0,77	0,73	0,231
15	Образец 24.5			24	0,50	0,63	0,81	0,73	0,243

Таблица 7

Оптимальные условия получения ГЭК со СЗ 0.4 и 0.5 при гидроксипроцессировании крахмала этиленхлоргидрином прямым способом.

№	Степень замещения	Температура реакции T, °C	Концентрация клейстера, % масс.	Соотношение реагентов N _{ИС} :N _{ЭХГ} :N _{NaOH}	Время с начала подачи ЭХГ, ч
1	0,4	30	21	1 : 1,2 : 1,0	20,0
2	0,5			1 : 1,2 : 1,4	18,0

Для обратного способа загрузки результаты представлены ниже.

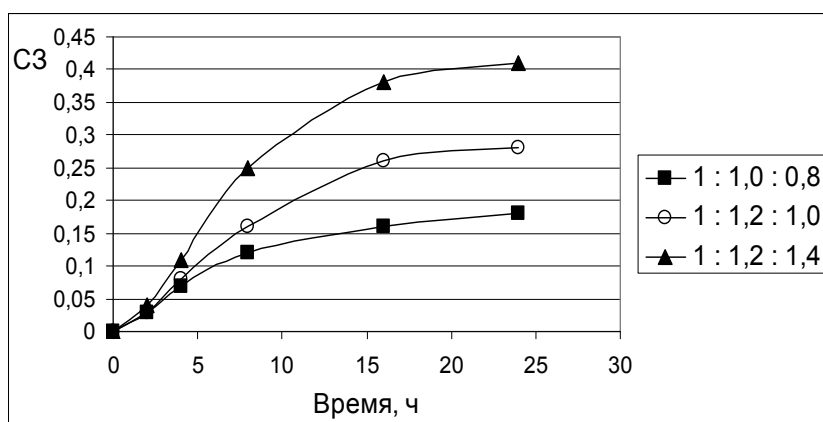


Рис. 10. Рост степени замещения во времени при обратном способе дозировки ЭХГ

На основании данных таблицы 8 и рис.10 были определены оптимальные условия реакции для получения ГЭК со СЗ 0,4: соотношение реагентов N_{ИС}:N_{ЭХГ}:N_{NaOH} = 1:1,2:1,4; 20 часов, 30°C.

Таблица 8

Характеристики процесса и продуктов реакции при различных соотношениях крахмал/ЭХГ/NaOH при обратном способе загрузки

№	Шифр образца	Температура реакции T, °C	Соотношение реагентов $N_{\text{ИС}}:N_{\text{ЭХГ}}:N_{\text{NaOH}}$	Время с начала подачи ЭХГ, ч	СЗ = $X_{\text{ИС}}$	МЗ	$X_{\text{ЭХГ}}$	$\Phi^{\text{ГЭК}}_{\text{ЭХГ}}$	$A_{\text{уд}}$
1	Образец 25.1	30	1 : 1,0 : 0,8	2	0,03	0,03	0,10	0,55	0,032
2	Образец 25.2			4	0,07	0,09	0,23	0,55	0,045
3	Образец 25.3			8	0,12	0,15	0,33	0,53	0,053
4	Образец 25.4			16	0,16	0,20	0,48	0,51	0,065
5	Образец 25.5			24	0,18	0,22	0,50	0,52	0,082
6	Образец 26.1		1 : 1,2 : 1,0	2	0,03	0,04	0,10	0,66	0,035
7	Образец 26.2			4	0,08	0,12	0,19	0,64	0,057
8	Образец 26.3			8	0,16	0,21	0,33	0,62	0,082
9	Образец 26.4			16	0,26	0,32	0,50	0,61	0,115
10	Образец 26.5			24	0,28	0,35	0,56	0,61	0,132
11	Образец 27.1		1 : 1,2 : 1,4	2	0,04	0,06	0,11	0,73	0,038
12	Образец 27.2			4	0,11	0,14	0,20	0,71	0,106
13	Образец 27.3			8	0,25	0,30	0,42	0,69	0,148
14	Образец 27.4			16	0,38	0,44	0,65	0,67	0,173
15	Образец 27.5			24	0,41	0,48	0,69	0,68	0,182

3.2.2.4. Сравнительный анализ методов синтеза ГЭК.

Наибольший интерес, с позиции производства фармацевтических субстанций, представляют ГЭК со СЗ 0,4, 0,5 и 0,7. Ниже приведены сравнительные характеристики образцов ГЭК с одинаковой степенью замещения, полученные разными способами. Наиболее перспективным является ГЭК со СЗ 0,4 (таблица 9).

Таблица 9

Сравнительные характеристики образцов ГЭК со СЗ 0.4

№	Шифр образца	Тип АА	Катализатор	Температура, °C	Время реакции, ч	X_{AA}	$\Phi^{\text{ГЭК}}_{\text{AA}}$	$A_{\text{уд}}$
1	Образец 9	ЭО	NaCl	40	9	0,87	0,80	0,060
2	Образец 19	ЭО	NaOH	30	20	0,98	0,94	0,175
3	Образец 23	ЭХГ прямой	NaOH	30	20	0,72	0,69	0,205
4	Образец 27	ЭХГ обратный	NaOH	30	20	0,67	0,67	0,178

Как видно из данных таблицы 9, наименьшее время для достижения требуемого значения СЗ затрачивается в процессе гидроксипроцесса этилирования этиленоксидом в присутствии NaCl (обр.9), что связано, по всей вероятности, с более высокой температурой процесса. В этом же процессе, несмотря на более высокую температуру, имеет место наименьшая $A_{\text{уд}}$, что объясняется наиболее низким значением pH среды, по сравнению с другими процессами. Наибольшая селективность по ГЭК и степень превращения алкилирующего агента

наблюдается в случае реакции гидроксиэтилирования ЭО с щелочным катализатором. Оба способа с применением ЭХГ значительно уступают по основным показателям способам, связанным с применением ЭО. Вместе с тем, при использовании ЭХГ имеются преимущества, прежде всего, технологического характера. При этом, процесс с обратным способом дозирования ЭХГ даже при близких значениях $\Phi_{AA}^{ГЭК}$ и X_{AA} характеризуется значительно меньшей $A_{уд}$.

Наиболее широко используется ГЭК со СЗ 0,5, характеристики образцов такого ГЭК, полученного нами, представлены в таблице 10.

Таблица 10

Сравнительные характеристики образцов ГЭК со СЗ 0.5

№	Шифр образца	Тип АА	Катализатор	Температура, °С	Время реакции, ч	X_{AA}	$\Phi_{AA}^{ГЭК}$	$A_{уд}$
1	Образец 10	ЭО	NaCl	40	13	0,82	0,76	0,135
2	Образец 20	ЭО	NaOH	30	13	0,92	0,95	0,192
3	Образец 24	ЭХГ прямой	NaOH	30	18	0,78	0,73	0,235

Наиболее оптимальным по селективности $\Phi_{AA}^{ГЭК}$ и степени превращения X_{AA} является способ гидроксиэтилирования ЭО в присутствии NaOH. Использование в качестве катализатора NaCl может быть предпочтительно только с позиции $A_{уд}$. Образцы, полученные с применением ЭХГ уступают по всем характеристикам образцам, синтезированным с помощью ЭО. Однако, для ГЭК со СЗ 0,5, как и для СЗ 0,4, использование ЭХГ может быть оправдано с точки зрения безопасности технологического процесса.

С целью получения фармацевтической субстанции ГЭК со СЗ 0,7 наиболее перспективна реакция в присутствии NaOH (таблица 11) из-за более высоких значений $\Phi_{AA}^{ГЭК}$ и X_{AA} , а также ввиду близких величин $A_{уд}$.

Таблица 11

Сравнительные характеристики образцов ГЭК со СЗ 0.7

№	Шифр образца	Тип АА	Катализатор	Температура, °С	Время реакции, ч	X_{AA}	$\Phi_{AA}^{ГЭК}$	$A_{уд}$
1	Образец 11	ЭО	NaCl	40	15	0,91	0,65	0,224
2	Образец 21	ЭО	NaOH	30	21	0,98	0,90	0,257

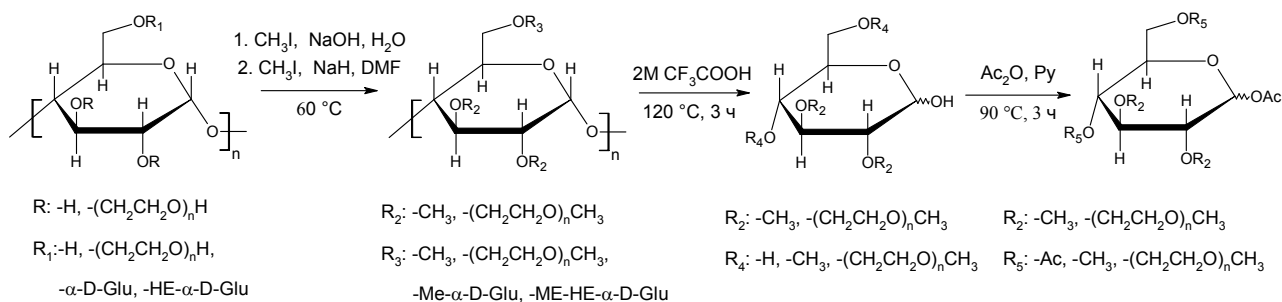
3.3. Метод определения тонкой структуры продуктов гидроксиэтилирования полисахаридов

Положение гидроксиэтильной группы в глюкопиранозном остатке существенно влияет на резистентность гликозидной связи к амилолитическим ферментам. В этой связи, тонкая структура ГЭК напрямую определяет его устойчивость к расщеплению, тем самым,

обеспечивая его кровезамещающие свойства. Для установления тонкой структуры ГЭК нами был разработан комплексный метод. Согласно этому методу, ГЭК или другой полисахарид подвергался избыточному двух стадийному метилированию по свободным гидроксильным группам, последующему исчерпывающему кислотному гидролизу до соответствующих моносахаридов и ацелированию гидроксильных групп, образующихся после гидролиза гликозидных связей. Полученную смесь модифицированных моносахаридов анализировали методом хромато-масс спектрометрии. Количественное соотношение полученных продуктов позволяло определить структуру исходного полимера.

Известные для полисахаридов способы метилирования не позволили получить полностью метилированный ГЭК. Поэтому избыточного метилирования удалось достичь лишь в случае двух стадийного процесса: на первой стадии проводили метилирование водного раствора ГЭК до СЗ~2 в присутствии NaOH, на второй – в растворе ДМФА в присутствии NaN, АА на обеих стадиях являлся CH₃I. После каждой стадии проводили диализ реакционной массы для удаления низкомолекулярных примесей.

Последовательность модификации ГЭК и его расщепления до моносахаридов представлена на схеме:



Газовая хроматограмма смеси модифицированных моносахаридов приведена на рисунке 11.

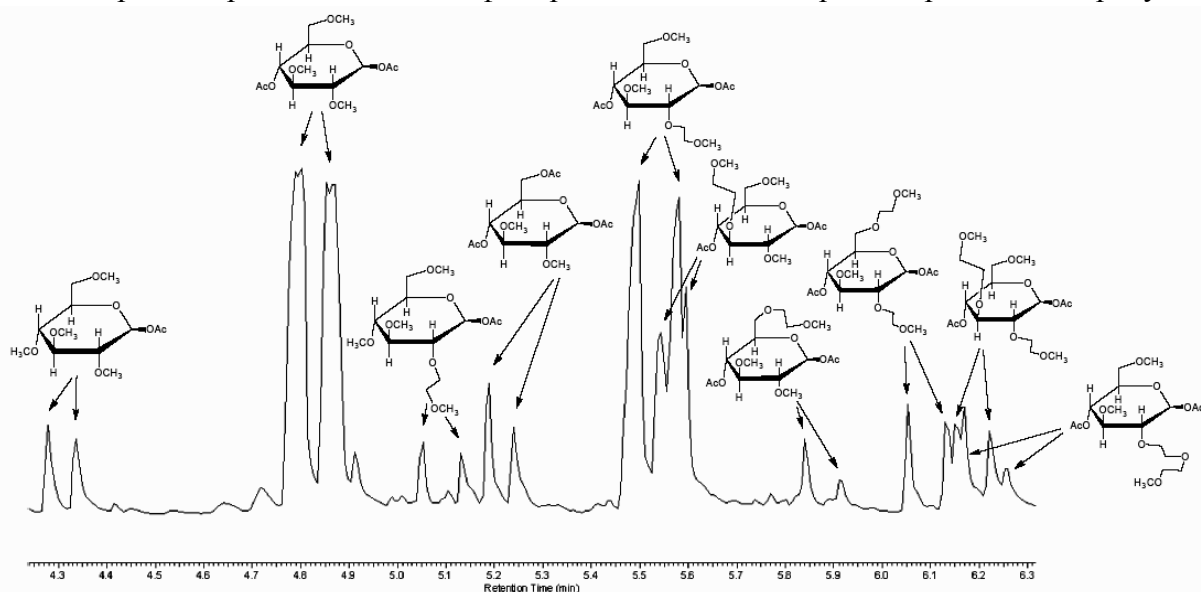


Рис.11. Типичная газовая хроматограмма смеси модифицированных полисахаридов.

Отнесение пиков проводили с помощью масс-спектрометрии по характерным осколочным пикам при регистрации спектров в режиме электронного удара (70 эВ). На рисунке 12 приведен типичный масс-спектр одного из моносахаридов.

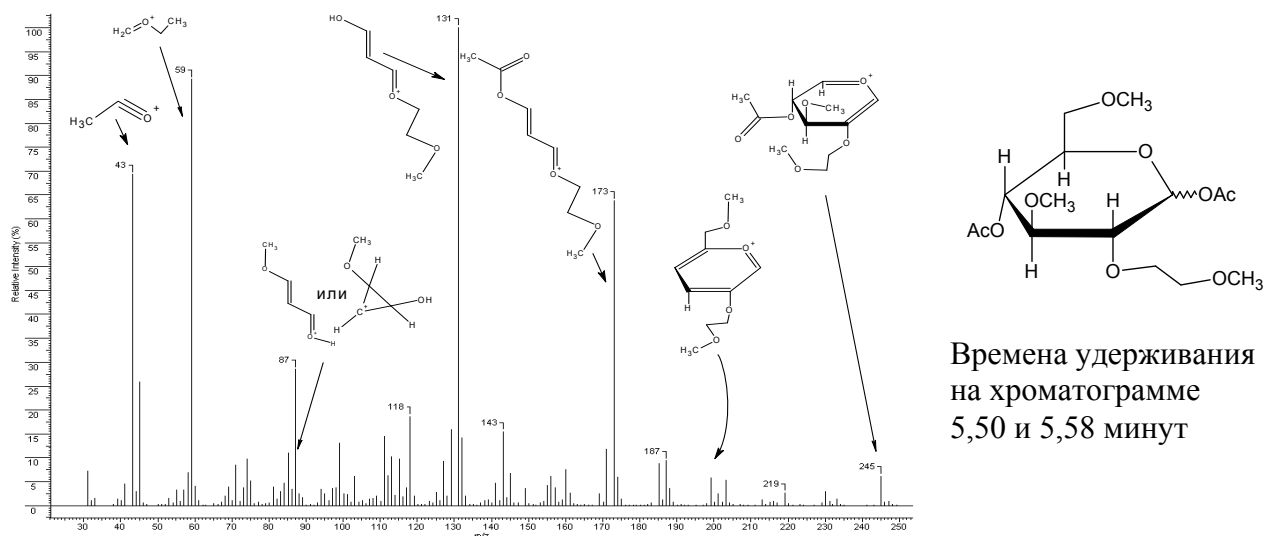


Рис. 12. Масс спектр 1,4 -диацетил-3,6-диметил-2-(2-метоксиэтил)-глюкозы, полученный в режиме электронного удара.

В таблице 12 представлены данные по расшифровке пиков газовой хроматограммы смеси модифицированных полисахаридов.

Таблица 12

Расшифровка пиков газовой хроматограммы смеси модифицированных полисахаридов

Формула соединения	Время удерживания мин	Обозначение	Формула соединения	Время удерживания мин	Обозначение
	4,28 4,34	M1		5,54 5,59	M6
	4,80 4,85	M2		5,84 5,91	M7
	5,05 5,13	M3		6,05 6,13	M8
	5,19 5,24	M4		6,15 6,22	M9
	5,50 5,58	M5		6,16 6,25	M10

С помощью данных таблицы 12, нами были выведены следующие формулы для расчета основных показателей характера распределения гидроксипропильных групп в макромолекуле полисахарида:

$$\text{Общая степень замещения} - C3 = \frac{I_{M3} + I_{M5} + I_{M6} + I_{M7} + I_{M8} + I_{M9} + I_{M10}}{\sum I_{Mi}} \quad (7)$$

$$\text{Степень замещения по С-2} - C3_2 = \frac{I_{M3} + I_{M5}}{\sum I_{Mi}} \quad (8)$$

$$\text{Степень замещения по С-3} - C3_3 = \frac{I_{M6}}{\sum I_{Mi}} \quad (9) \quad \text{где } I_{Mi} - \text{интегральная интенсивность пиков } Mi \text{ (см. таблицу 12)}$$

$$\text{Степень замещения по С-6} - C3_6 = \frac{I_{M7}}{\sum I_{Mi}} \quad (10)$$

$$\text{Степень полизамещения} - C3_{\text{поли}} = \frac{I_{M8} + I_{M9} + I_{M10}}{\sum I_{Mi}} \quad (11)$$

$$\text{Степень разветвления} - CP = \frac{I_{M4}}{\sum I_{Mi}} \approx \frac{I_{M1} + I_{M3}}{\sum I_{Mi}} \quad (12)$$

По вышеуказанным формулам были определены показатели характера распределения гидроксипропильных групп в макромолекулах ГЭК со СЗ 0,4 и 0,5, для образцов, полученных при оптимальных условиях, а также для образцов зарубежных аналогов. Все образцы, за исключением, ГЭК 130/0,4 характеризуются величиной молекулярной массы 200 кДа. Результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13

Характер распределения гидроксипропильных групп в макромолекулах ГЭК со СЗ 0,4 и 0,5

Шифр образца	СЗ	СЗ ₂	СЗ ₃	СЗ ₆	СЗ _{поли}	СР
Обр. 9 (ЭО + NaCl)	0,409	0,310	0,023	0,029	0,047	0,051
Обр. 19 (ЭО + NaOH)	0,406	0,326	0,022	0,022	0,036	0,050
Обр. 23 (ЭХГ прямой способ)	0,409	0,315	0,023	0,024	0,047	0,051
ГЭК 130/0,4 «Серум Верк» (Германия)	0,404	0,305	0,023	0,029	0,047	0,051
Обр. 10 (ЭО + NaCl)	0,504	0,396	0,010	0,029	0,069	0,052
Обр. 20 (ЭО + NaOH)	0,506	0,414	0,021	0,027	0,044	0,050
Обр. 24 (ЭХГ прямой способ)	0,503	0,397	0,024	0,029	0,054	0,049
ГЭК 200/0,5 «Аджиномотофарм» (Япония)	0,509	0,404	0,024	0,028	0,053	0,048

На основании данных таблицы 13 можно сделать заключение о схожем характере распределения гидроксипропильных групп в макромолекулах ГЭК между образцами с близкими СЗ. Однако, для образцов 19 и 20, полученных гидроксипропилированием крахмала

этиленоксидом в присутствии NaOH, наблюдается наибольшая степень замещения по С-2, по сравнению с другими образцами, при этом доля полизамещенных остатков ниже. Такое распределение, вероятно, связано с высокой активностью катализатора и алкилирующего агента.

Следует отметить, что в качестве исходного сырья для получения образцов ГЭК использовали обычный пищевой крахмал из кукурузы, который подвергали кислотному гидролизу с последующей очисткой от амилозы (см. раздел 3.1). Образцы зарубежных производителей по данным сопроводительной документации были изготовлены из кукурузного (ГЭК 200/0,5) и картофельного (ГЭК 130/0,4) крахмалов специальных сортов с высоким (не менее 95%) содержанием амилопектина. По данным таблицы 13, видно, что все образцы имеют близкие величины CP , что говорит о схожем строении исходного амилопектина, а также о возможности их использования для получения субстанции ГЭК.

3.4. Конформационный анализ макромолекул ГЭК

Уникальные свойства амилопектина, этого разветвленного неоднородного по структуре полисахарида, вызваны исключительно большим числом лабильных конформационных состояний, меняющихся за очень короткий промежуток времени из-за низких барьеров вращения глюкопиранозных остатков вокруг глюкозидных связей и связей С-О в гидроксильных группах, а также влиянием водородного связывания в межмолекулярном взаимодействии их цепей с окружающими молекулами воды. Указанное свойство амилопектина затрудняет распознавание его структуры антителами, обеспечивая его длительное пребывание в кровяном русле. Известно, что в случае многоэкстремальных молекул полисахаридов существенный вклад в относительную устойчивость конформеров вносит энтропийный фактор. Для оценки его влияния при введении гидроксипропильных групп в молекулу амилопектина нами был проведен конформационный анализ фрагментов цепей ГЭК разного состава и строения в рамках аддитивной модели атом-атомных потенциальных функций (ААПФ).

Строгий расчет конформационной энтропии многоэкстремальных молекул моносахаридов с учетом статистического вклада каждого конформационного состояния — задача исключительно трудоемкая, а в случае олиго- и полисахаридов она сопряжена с практически непреодолимыми вычислительными трудностями. В рамках модели ААПФ нами были исследованы конформационные состояния моно-, ди-, три-ОМе- α -D-глюкопиранозидов и моно-, ди-, три-ОМе-О-гидроксипропил- α -D-глюкопиранозидов при любых возможных способах замещения, которые являются наиболее простыми модельными соединениями, на которых можно проследить основные пространственные эффекты и

закономерности, связанные с замещением атомов водорода ОН-групп при построении макромолекул ГЭК. Для каждой модели было рассчитано число разрешенных конформационных состояний N_p (таблица 14).

Таблица 14

Число разрешенных конформационных состояний (N_p) в моно-, ди-, три-ОМе- α -D-глюкопиранозидах (I) и моно-, ди-, три-ОМе-О-гидроксиэтил- α -D-глюкопиранозидах (II)

Модель	Тип фрагмента	N_p
1-ОМе- α -D-глю	Концевой незамещенный фрагмент	320
4-ОМе- α -D-глю	Первый незамещенный фрагмент	240
1,4-Ди-ОМе- α -D-глю	Центральный незамещенный фрагмент	200
1,4,6-Три-ОМе- α -D-глю	Центральный разветвленный незамещенный фрагмент	147
1,4-Ди-ОМе-2-ГЭ- α -D-глю	Центральный замещенный фрагмент при С2	3528
1,4-Ди-ОМе-3-ГЭ- α -D-глю	Центральный замещенный фрагмент при С3	3528
1,4-Ди-ОМе-6-ГЭ- α -D-глю	Центральный замещенный фрагмент при С6	3150
1,4,6-Три-ОМе-2-ГЭ- α -D-глю	Центральный разветвленный замещенный фрагмент при С2	2998
1-ОМе-2-ГЭ- α -D-глю	Концевой замещенный фрагмент при С2	5830
1-ОМе-3-ГЭ- α -D-глю	Концевой замещенный фрагмент при С3	4096
1-ОМе-6-ГЭ- α -D-глю	Концевой замещенный фрагмент при С6	4888

Рассматривая ротационные состояния соседних звеньев амилозы, амилопектинового крахмала и семейства ГЭК как независимые, исходя из адекватности ротационных запретов в указанных полисахаридах и в модельных соединениях - молекулах типа I и II, можно предсказать максимально возможное число конформеров в этих полисахаридах (N). Исходя из типа и степени разветвления, а также степени и характера замещения нами была выведена формула для расчета числа разрешенных конформационных состояний макромолекул амилозы, амилопектинового крахмала, его гидроксиэтильных производных:

$$N = \prod_{1,4,k}^3 N_{1,4,k}^{n(1-2p)q} \cdot N_{1,4}^{n(1-2p)(1-q)} \cdot \prod_{1,4,6,k}^3 N_{1,4,6,k}^{np_u} \cdot N_{1,4,6}^{np(1-u)} \cdot \prod_{1,k}^4 N_{1,k}^{npt} \cdot N_1^{np(1-t)} \quad (13)$$

, где: p - СР, q – СЗ, u – доля монозамещенных звеньев с разветвлениями, (1 – u) – доля незамещенных звеньев с разветвлениями, t – доля монозамещенных i-концевых звеньев, (1 – t) – доля незамещенных i-концевых звеньев, n – общее число звеньев .

Поскольку подавляющая часть разрешенных конформеров имеет избыток энергии менее 1 ккал/моль, их можно считать равновероятными и с удовлетворительной точностью оценить энтропию смешения по формуле:

$$S = R \cdot \ln N \quad (14)$$

По формулам 13 и 14 в пересчете на одно звено определены числа разрешенных конформационных состояний, удельные конформационные энтропии ($n=1$) амилозы и амилопектина с различными молекулярными массами (рис.13), а также ГЭК (рис.14) с различными величинами СЗ с учетом характера распределения групп, полученного с помощью данных метода хроматомасс-спектрометрии (раздел 3.3).

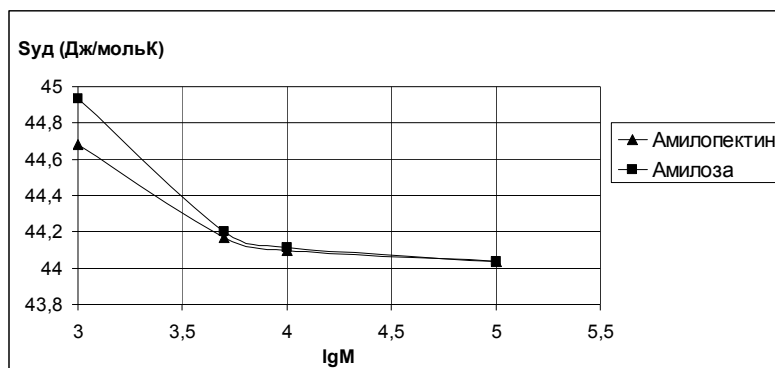


Рис.13 Влияние молекулярной массы амилозы и амилопектина на удельную величину конформационной энтропии

Из рис.13 видно, что при значении ММ крахмальных полисахаридов более 100 кДа ($lgM=5$) ее изменение практически не влияет на величину $S_{уд}$.

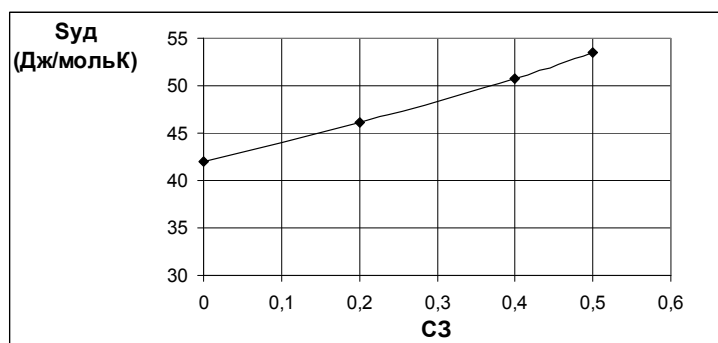


Рис.14 Влияние СЗ на удельную величину конформационной энтропии ГЭК

Рис.14 иллюстрирует тот факт, что при введении в молекулу амилопектина одной гидроксиэтильной группы на 2 остатка глюкозы имеет место увеличение удельной конформационной энтропии на 27%, что качественно характеризует улучшение объемозамещающих свойств ГЭК.

ГЛАВА 6. ПРИЛОЖЕНИЯ

6.1. Схема лабораторной установки для гидроксиэтилирования крахмала в водном растворе

Представлены схема разработанной нами лабораторной установки для гидроксиэтилирования крахмала в водном растворе и описание технологического процесса получения ГЭК.

6.2. Отчет о доклинических испытаниях субстанции ГЭК 200/0,5

Представлен отчет о проведении доклинических испытаний образцов субстанции ГЭК 200/0,5, синтезированных на ОПУ по разработанной нами технологии.

Глава 4. ВЫВОДЫ

1. Определены оптимальные условия проведения реакции гидроксиэтилирования крахмала этиленоксидом и этиленхлоргидрином (мольное соотношение крахмал : алкилирующий агент, температура, природа и концентрация катализатора). Сформулированы условия реакции для получения гидроксиэтилированного крахмала с требуемой степенью замещения.
2. Предложен новый подход к количественной оценке степени превращения реагентов и их селективности в реакции гидроксиэтилирования крахмала на основе ЯМР ^{13}C спектроскопии. Определены условия анализа молекулярно-массовых характеристик полученного полимера.
3. Показано, что для стандартизации гидроксиэтилированного крахмала, как основы лекарственных препаратов, может быть использован хромато-массспектрометрический метод исследования структуры продуктов полного кислотного гидролиза метилированного гидроксиэтилкрахмала.
4. Для прогнозирования свойств субстанции разработан математический аппарат конформационного анализа макромолекул олиго- и полисахаридов. Проведено сравнение значений конформационной энтропии для полисахаридов с различными величинами молекулярных масс и степеней превращения. Установлено, что увеличение степени гидроксиэтилирования приводит к росту конформационной энтропии.
5. Разработан технологический регламент получения субстанции гидроксиэтилированного крахмала и создана опытно-промышленная установка для получения субстанции гидроксиэтилированного крахмала. По данным доклинических испытаний, проведенных в Гематологическом научном центре РАМН, синтезированные продукты не уступают импортным аналогам и могут быть рекомендованы для создания отечественных кровезаменителей объемозамещающего действия и консервирующих растворов для органов и тканей.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:

1. Панов А.В., Травень В.Ф., Панов В.П. Конформационный анализ макромолекул гидроксиэтилированного крахмала // Хим.-фарм. журнал. – 2004. - №12. – С. 32-38.
2. Травень В.Ф., Панов А.В., Долотов С.М. и др. Сравнительный анализ продуктов гидроксиэтилирования картофельного и кукурузного крахмалов, методами газожидкостной хроматографии и ЯМР 13С спектроскопии // Хим. растит. сырья.- 2009.- №3.- С. 57-61.
3. Панов А.В., Мотовилов Д.В., Дубровин В.И. Определение состава препаратов для парентерального и энтерального питания методом ЯМР 13С // Научная конференция «Современные проблемы энтерального и парен-терального питания»: Тез. докл. – Гомель , 2002.– С. 77-78.
4. Панов А.В., Кирьянов Н.А., Панов В.П. Плазмозаменители на основе гидроксиэтилированного крахмала // V Съезд гематологов и трансфузиологов республики Беларусь «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии»: Тез. докл. – Минск, 2003.- С. 387.
5. Panov A.V., Traven V.F., Modern technologies of production of highly effective biologically degradative blood substitutes // Aims for future of engineering science: Тез.докл. – Париж, 2004.- С.1-2.
6. Панов А.В., Травень В.Ф., Долотов С.М., Бексаев С.Г. Получение субстанции гидроксиэтилированного крахмала 200/0,5// Московская международная конференция "Биотехнология и Медицина»: Тез.докл. – Москва, 2006.- С. 235.
7. Панов В.П., Панов А.В., Коротаев Г.К., Кирьянов Н.А. Долотов С.М. Лекарственное средство волемиического действия и способ его получения // Патент РФ № 2245714, 2005.