

*На правах рукописи*

**Курегян Анна Гургеновна**

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ  
ОБОСНОВАНИЕ ПОЛУЧЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ  
КАРОТИНОИДОВ И СОЗДАНИЕ НА ИХ ОСНОВЕ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

14.04.01 – технология получения лекарств

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора фармацевтических наук

Пермь, 2020

Работа выполнена в Пятигорском медико-фармацевтическом институте – филиале Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные консультанты:**

доктор фармацевтических наук, профессор

**Степанова Элеонора Федоровна**

доктор фармацевтических наук, профессор,  
заслуженный работник высшей школы

**Оганесян Эдуард Тоникович**

**Официальные оппоненты:**

**Гузев Константин Сергеевич** – доктор фармацевтических наук, заслуженный деятель науки РФ, ЗАО фармацевтическое научно-производственное предприятие «Ретиноиды», отдел обеспечения качества, уполномоченное лицо;

**Федосеева Людмила Михайловна** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармации, профессор кафедры;

**Кондаков Сергей Эмильевич** – доктор фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», кафедра химической кинетики, ведущий научный сотрудник.

**Ведущая организация:**

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск.

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2, тел. (342) 233-55-01).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46) и на сайте (<http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук

**Замараева Татьяна Михайловна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Второе десятилетие XXI века можно считать периодом зарождения новой концепции фармацевтической науки и производства, что обусловлено внедрением инновационных промышленных продуктов и технологий.

Возможности расширения ассортимента эффективных и безопасных отечественных лекарственных средств (ЛС), в том числе непосредственно связанных со сформировавшейся проблемой импортозамещения, могут быть осуществлены с учетом внедрения в медицинскую практику оригинальных лекарственных препаратов природного происхождения. Наряду с этим утверждение «дорожной карты» направления Healthnet («Превентивная медицина») на период с 2017 до 2035 гг., разработанного Национальной технологической инициативой, открывает перспективу импорта отечественных ЛС природного происхождения. В этом контексте возрастает актуальность получения и исследования индивидуальных природных соединений. Вместе с тем производственная сфера характеризуется узким диапазоном использования этого типа фармацевтического продукта, хотя на такие субстанции имеется значительный спрос, и с позиции эффективности и минимизированных побочных действий они могут успешно конкурировать со многими синтетическими аналогами. Расширению рынка ЛС на основе индивидуальных природных соединений препятствует отсутствие единых технологических и аналитических подходов к получению и анализу фармацевтических субстанций природного происхождения.

В связи с вышесказанным реализация исследований с целью решения настоящей проблемы является актуальным и перспективным направлением с точки зрения создания методологической модели теоретически обоснованных научных исследований и производства индивидуальных субстанций природного происхождения.

Перспективным, на наш взгляд, является выбор в качестве объектов исследования индивидуальных природных каротиноидов. Эти соединения могут стать удобными моделями для разработки научно-практических методологических схем и будут востребованы современной медицинской и фармацевтической практикой, т.к. особенности их биохимических и физико-химических свойств создают предпосылки для создания отечественных таргетных ЛС. В настоящее время на фармацевтическом рынке Российской Федерации ЛС на основе каротиноидов представлены суммарными препаратами и практически лишены инновационных форм, хотя совершенствование в этом плане вполне целесообразно и актуально.

Таким образом, все вышеизложенное свидетельствует о многогранности проблемы, решение которой следует осуществлять комплексно.

**Степень разработанности темы.** Согласно данным ВИНТИ РАН за последние 19 лет был выполнен ряд исследований в фармацевтической отрасли, посвященных различным аспектам выделения и изучения каротиноидов. Так, О.В. Северцевой (2000 г.) разработаны и изучены биофармацевтические и технологические аспекты создания лекарственных форм (ЛФ) препаратов из каротиноидсодержащих растений. С.В. Первушкиным (2000 г.) были проведены комплексные исследования ЛС, содержащих сумму природных биологически активных веществ (БАВ), в том числе и каротиноидов. В 2001 г. А.В. Сергиенко было проведено фармакологическое обоснование использования ЛФ с  $\beta$ -каротином в условиях экспериментальной патологии. В.В. Шелестовой (2002 г.) изучались аналитические возможности стандартизации ЛС, содержащих  $\beta$ -каротин и ликопин. Исследования по разработке методологии микробиологического синтеза  $\beta$ -каротина и ликопина в 2004 г. были проведены А.С. Гавриловым. В работах О.О. Поправки (2000 г.), А.А. Чахировой (2008 г.),

И.В. Малининой (2011 г.) затронуты отдельные вопросы технологии получения ЛФ, содержащих сумму каротиноидов.

Вместе с тем следует отметить, что систематизация теоретического и экспериментального материала по разработке унифицированной технологии выделения индивидуальных каротиноидов из природных источников и ее аналитическому сопровождению, а также созданию методологических подходов к получению, стабилизации и анализу ЛФ, содержащих субстанции каротиноидов, ранее не проводилась.

**Цель исследования** – создание теоретических основ получения и анализа индивидуальных природных каротиноидов, разработка на их основе оптимальных лекарственных форм и решение вопросов стандартизации.

Для реализации поставленной цели следует решить следующие **задачи**:

1) провести анализ результатов информационно-патентного поиска с целью обоснования перспективности теоретического и экспериментального исследования каротиноидов в виде моносоединений;

2) на основании комплексных технологических исследований теоретически обосновать и экспериментально апробировать унифицированный способ получения индивидуальных каротиноидов;

3) осуществить оптимизацию технологии получения индивидуальных каротиноидов методом математического планирования эксперимента;

4) используя методы и приемы современной аналитической химии, предложить единый подход к анализу соединений этого класса;

5) обосновать условия стабилизации субстанций каротиноидов и получить стабильные субстанции этих соединений;

6) предложить оптимальную ЛФ для стабилизированных индивидуальных каротиноидов и осуществить решение общих вопросов их анализа;

7) изучить возможность применения предложенных подходов к анализу каротиноидов для контроля качества лекарственного препарата промышленного производства, содержащего данную группу соединений;

8) с учетом полученных теоретических и экспериментальных данных создать методологическую основу для прогнозирования результатов технологических и аналитических исследований каротиноидов в нотации IDEF0.

**Научная новизна исследования** заключается в следующем:

➤ предложены оптимальные технологические решения, касающиеся получения индивидуальных каротиноидов природного происхождения;

➤ впервые осуществлено построение математической модели выделения индивидуальных каротиноидов для оптимизации технологии их получения;

➤ проведена конкретизация предложенного технологического подхода применительно к особенностям сырьевых источников, заключающаяся в экстракционном разделении каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов;

➤ новизна технологии получения субстанций каротиноидов подтверждена патентами Российской Федерации «Способ получения индивидуальных каротиноидов» (патент РФ №2648452) и «Способ разделения каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов листьев крапивы двудомной» (патент РФ № 2659165);

➤ обобщены и систематизированы подходы к анализу каротиноидов и ЛС на их основе;

- обоснованы условия и принципы стабилизации субстанций каротиноидов и технологии получения их ЛФ;
- адекватность предложенных аналитических приемов подтверждена в процессе анализа уже зарегистрированного в Российской Федерации препарата, содержащего каротиноиды;
- впервые для фармацевтической отрасли сконструирована и представлена методологическая концепция получения природных субстанций каротиноидов, технологии их ЛФ и аналитического сопровождения этих процессов в нотации IDEF0.

**Теоретическая и практическая значимость.** Технологическая концепция экстракционного получения индивидуальных каротиноидов обеспечивает получение субстанций индивидуальных каротиноидов из сырья растительного и животного происхождения (патент РФ №2648452, патент РФ №2659165).

Построенная математическая модель оптимизации технологии получения каротиноидов (на примере  $\beta$ -каротина, ликопина, лютеина, астаксантина) способствует ее масштабированию и адаптации к производственным условиям.

Системный подход к анализу соединений группы каротиноидов является методологической основой аналитического сопровождения технологии получения субстанций каротиноидов и служит отправной точкой их стандартизации.

Предложенная методология изучения каротиноидов, получения субстанций каротиноидов, ЛФ на их основе и аналитическое сопровождение этих процессов в нотации IDEF0 позволяют формировать дизайн любого исследования этой группы БАВ.

Спектрофотометрические методики количественного определения облепихового масла включены в фармакопейную статью предприятия ЗАО «Вифитех» «Облепиховое масло. Масло для приема внутрь, местного и наружного применения» (НД № ЛП 002408-210314).

Методики определения подлинности каротиноидов методом спектрофотометрии апробированы в условиях предприятия ЗАО «Вифитех» и рекомендованы для внесения в проект Изменений № 1, раздел «Подлинность» к НД № ЛП 002408-210314 «Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения» (акт внедрения от 18.01.2018).

Методики ТСХ-анализа каротиноидов облепихового масла апробированы в условиях предприятия ЗАО «Вифитех» и рекомендованы для внесения в проект Изменений № 1, раздел «Подлинность» к НД № ЛП 002408-210314 «Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения» (акт внедрения от 18.01.2018).

Сравнительный «слепой» анализ образцов облепихового масла позволил провести выбор образца с оптимальной технологией получения (акт внедрения от 18.01.2018).

Результаты разработки технологии получения микрокапсул оформлены в виде лабораторного регламента. Основная технологическая стадия производства апробирована в условиях предприятия ООО «Витаукт-пром» (акт апробации от 18.12.2018).

Результаты аналитического изучения каротиноидов методами ТСХ и ВЭЖХ включены в учебное пособие «Хроматографические методы в анализе лекарственных средств», рекомендованное УМО по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебного пособия для студентов фармацевтических вузов и фармацевтических факультетов, обучающихся по специальности «фармация» (письмо №40/05.05-20 от 30.12.2014). Пособие используется в учебном процессе (акты внедрения от 01.03.2018, г. Екатеринбург; от 14.05.2018, г. Москва; от 21.05.2018, г. Пятигорск).

Результаты аналитического изучения каротиноидов методом ИК-спектроскопии включены в учебное пособие «Спектроскопия в инфракрасной области и ее использование в фармацевтическом анализе», рекомендованное УМО по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебного пособия для студентов фармацевтических вузов и фармацевтических факультетов, обучающихся по специальности «фармация» (письмо №355/05.05-20 от 08.10.2014). Пособие используется в учебном процессе (акт внедрения от 23.04.2019, г. Пятигорск).

**Методология и методы исследования.** Основой методологии является соблюдение системного подхода при проведении исследования, опубликованные в печати труды ученых по изучаемой проблематике, законодательные документы РФ, нормативные и правовые акты Минздрава РФ.

В процессе выполнения исследования были использованы логический и ретроспективный методы; варианты методов критического и экономико-математического анализов, а именно: методы сравнения, группировки, графический метод; метод функционального моделирования (нотация IDEF0); методы комплексного подхода, технологические, химические, физические, физико-химические и статистические методы.

**Положения, выносимые на защиту:**

- результаты теоретического и экспериментального обоснования технологии получения индивидуальных каротиноидов;
- результаты эксперимента, отражающие разработку системного подхода к аналитическому сопровождению технологии получения фармацевтических субстанций индивидуальных каротиноидов;
- результаты по созданию технологии стабилизации субстанций каротиноидов и получения ЛФ на их основе;
- результаты совершенствования способов анализа ЛС промышленного производства, содержащего каротиноиды;
- результаты конструирования методологии изучения каротиноидов и создания на их основе ЛС в нотации IDEF0.

**Степень достоверности и апробация результатов исследования.** Достоверность полученных результатов достигнута благодаря использованию современных технологических, химических, физико-химических, математических методов, позволяющих получать воспроизводимые и достоверные результаты. Все данные обработаны математически и являются статистически достоверными.

Результаты и основные положения диссертационного исследования доложены и обсуждены на: 17-й Международной научно-практической конференции «Экономика, социология и право в современном мире: проблемы и поиски решений» 7 – 8 июня 2013 г., г. Пятигорск; XXI Международной научно-практической конференции «Современная медицина актуальные вопросы» 29 июля 2013 г., г. Новосибирск; XII Международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований» 27 – 28 марта 2015 г., г. Москва; XVI Международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований» 24 – 2 июля 2015 г., г. Москва; IV Международной научно-практической конференции «Вопросы современной науки: проблемы, тенденции и перспективы» 13 июля 2016 г., г. Москва; II Международной научно-практической конференции «Медицина и фармакология: научные приоритеты ученых» 15 ноября 2017 г., г. Пермь; Межрегиональной научно-практической конференции «Маркетинговые исследования по совершенствованию лекарственного обеспечения населения и медицинских организаций»,

посвященной 55-летию кафедры Организации и экономики фармации Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России 23 марта 2015 г., г. Пятигорск; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы современной фармацевтической технологии» 29 апреля 2016 г., г. Пятигорск; Международной научно-практической конференции «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине» 23 – 25 июня 2016 г., г. Москва; V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Беликовские чтения» 6 – 7 декабря 2016 г., г. Пятигорск; 75-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» 11 – 12 мая 2017 г., г. Пятигорск; VII Международной научно-практической конференции «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки» 23 – 25 июня 2017 г., г. Владикавказ, Международной научно-практической конференции «Фармацевтическая технология: вчера, сегодня, завтра» 17 – 18 апреля 2019 г., г. Пятигорск.

**Личный вклад автора.** Автором самостоятельно определены основные направления исследования, сформулированы цели и задачи работы, осуществлен информационно-патентный поиск. Авторский вклад является определяющим в решении практических задач исследования. Личная заслуга автора состоит в интерпретации экспериментальных данных и системном теоретическом анализе результатов исследования. Автором проведено конструирование методологической концепции в нотации IDEF0. Непосредственным является участие автора в подготовке материалов для публикаций и их дальнейшем представлении на научных конференциях и конгрессах. Оформление диссертационной работы выполнено автором самостоятельно.

**Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, тема утверждена на заседании Ученого совета протокол №12 от 13 апреля 2016 г., Протокол №7 с изменениями от 17 января 2018 г.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют формулам специальностей 14.04.01 – технология получения лекарств и 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальностей, конкретно пунктам 1, 3, 4 паспорта специальности 14.04.01 – технология получения лекарств и пунктам 1, 2, 3, 6 паспорта специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 35 печатных работ, включая 2 патента РФ. Из списка печатных работ 17 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 379 страницах печатного текста, содержит 76 таблиц, 81 рисунок. Работа включает следующие разделы: введение, список использованных сокращений, обзор литературы (Глава 1); главу 2 (объекты, материалы, методы исследования); 5 глав собственных исследований; общее заключение; список литературы (376 источников, из которых 127 иностранных), приложения.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Современные аспекты фармацевтического исследования каротиноидов

В **обзоре литературы** изложена социально-медицинская значимость каротиноидов, приведены основные сведения о нормах потребления основных каротиноидов и их содержанию в природных источниках, описаны технологические подходы получения каротиноидов, а также состояние и перспективы анализа этих соединений. Дана характеристика процессу микрокапсулирования и его значимости в создании и стабилизации ЛС. Представлены сведения о функциональном моделировании производственно ориентированных систем.

Анализ данных литературы показал, что в настоящее время сформировалась приемлемая экспериментальная база для дальнейшего развития исследований в области технологии получения каротиноидов в виде моносоединений. Однако не существует единой методологии получения индивидуальных каротиноидов различной природы, и отсутствуют какие-либо сведения по применению микрокапсулирования в отношении этих соединений. Для изучения каротиноидов применяется весь арсенал современных физико-химических методов, но при этом не сформирована единая концепция фармацевтического изучения этого класса БАВ с учетом комплексного взаимного использования возможностей аналитических методов, а также их поэтапного применения при изучении, получении, стабилизации и технологии ЛФ на основе каротиноидов.

Технология структурного анализа и проектирования (SADT), а именно нотация IDEF0, является перспективным и актуальным инструментарием для создания методологии исследования и работы с БАВ, в частности каротиноидов с целью создания ЛФ на их основе. Обзор литературы явился обоснованием для выбора сырьевых источников каротиноидов: корнеплодов моркови и мякоти плодов тыквы ( $\beta$ -каротин); томатов и продуктов переработки томатов (ликопин); листьев крапивы двудомной (лютеин); панцирей креветок (астаксантин). В качестве объектов исследования определены индивидуальные каротиноиды-маркеры:  $\beta$ -каротин, ликопин (каротины), лютеин, астаксантин (ксантофиллы).

### Объекты, материалы и методы исследования

Реализацию экспериментальной части исследования проводили с применением следующих методов: технологических – жидкостной экстракции (ремацерация), микрокапсулирования (простая коацервация, экструзия, диспергирование в несмешивающейся жидкости); аналитических – ЯМР, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии, спектрофотометрии в УФ- и видимой областях, колоночной хроматографии, ТСХ, ВЭЖХ, ГЖХ; вариантов методов критического и экономико-математического анализов и технологии SADT в нотации IDEF0.

Дизайн исследования представлен на рисунке 1. Принимая во внимание то, что изучение каротиноидов – это многофункциональный процесс, результирующим фрагментом которого должна стать методология создания ЛФ на их основе, мы провели предварительное моделирование экспериментального модуля дизайна исследования в нотации IDEF0 (Рисунок 2).

Построение модели практической части работы позволит теоретически обосновать, детализировать и логически выстроить эксперимент, спрогнозировать его результат, структурировать получаемые данные, выявить связи между его технологическим и аналитическим аспектами. В свою очередь, экспериментальные данные, полученные при проведении исследования, должны стать базисом для создания обобщенной методологии IDEF0 получения ЛФ на основе индивидуальных каротиноидов и подтвердить или опровергнуть адекватность начальных теоретических предположений.



Рисунок 1 – Дизайн исследования



Рисунок 2 – Контекстная диаграмма модели IDEF0 экспериментального модуля исследования

Обобщенность контекстной диаграммы, комплексное решение технологических и аналитических задач эксперимента, стремление получить адекватный результат предопределили ее детализацию (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Декомпозиция экспериментальной части исследования

Теоретически общая идея эксперимента может быть представлена следующим образом:

- обоснование и разработка технологии получения четырех субстанций каротиноидов-маркеров – блок A1 диаграммы декомпозиции;
- всестороннее современное аналитическое исследование полученных субстанций, включающее подтверждение их структуры, – блок A2 диаграммы декомпозиции;
- стабилизация субстанций каротиноидов и получение оптимальной ЛФ с каждым из четырех каротиноидов-маркеров – блок A3 диаграммы декомпозиции;
- применение разработанных аналитических приемов на уже зарегистрированном в РФ ЛС с каротиноидами – блок A4 диаграммы декомпозиции;
- окончательное структурирование результатов эксперимента и построение обобщенной IDEF0 модели создания ЛФ на основе каротиноидов – блок A5 диаграммы декомпозиции.

### Теоретическое и экспериментальное обоснование технологии получения

Теоретически и экспериментально обоснована технология получения субстанций каротиноидов и проведена ее оптимизация. Данный этап эксперимента был выполнен в соответствии с блоком A1 диаграммы декомпозиции дизайна исследования в нотации IDEF0 (Рисунки 2, 3).

Применяя классические методы аналогии и моделирования и базируясь на результатах эксперимента, мы решили поставленную задачу на примере получения индивидуальных каротиноидов-маркеров, в частности,  $\beta$ -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина.

Поскольку каротиноиды являются термолабильными соединениями, то сушка исходного сырья при температуре 100-105 °С исключается. В тоже время эта стадия необходима,

поскольку положительно влияет на эффективность процесса экстракции. С учетом физико-химических особенностей каротиноидов обоснован и экспериментально подтвержден следующий режим сушки всех видов исходного сырья: температура – 40 °С, без доступа света, до остаточной влажности сырья не более 15 %. Эти показатели по определению влажности учитывались во всех дальнейших расчетах.

Одним из факторов, оказывающих существенное влияние на эффективность экстракции, является способ и степень измельчения сырья. Результаты эксперимента подтвердили, что комбинированное измельчение сырья до размера частиц не более 0,5 мм позволяет получить первичный экстракт с большим содержанием каротиноидов, что было использовано в последующем эксперименте.

В связи с тем что неполярные органические растворители, традиционно используемые для экстракции каротиноидов, извлекают, как правило, всю липофильную фракцию, то минимизировать этот процесс можно, проводя частичное омыление некоторых групп БАВ. На основании данных литературы и дополнительно проведенных собственных исследований в качестве омыляющего агента нами предложен 4 % раствор натрия гидрокарбоната.

Принимая во внимание физико-химические особенности каротиноидов, мы сочли целесообразным предложить такой метод экстракции, при котором имеет место минимальное «разрушающее» влияние самого процесса на структуру каротиноидов, а также максимальное истощение сырья. При этом следует учитывать простоту и доступность аппаратного оснащения процесса с учетом перспективы промышленной реализации технологической модели. Заданным критериям отвечает метод ремацерации. В качестве экстрагентов использованы н-гексан, петролейный эфир, хлороформ, ацетон, спирт этиловый 95 %.

С учетом этих термолабильных свойств при разработке технологии получения индивидуальных каротиноидов нами в качестве рабочей была выбрана температура 20 °С.

Далее для этапа экстракции экспериментально было определено оптимальное значение гидромодуля (Рисунок 4).

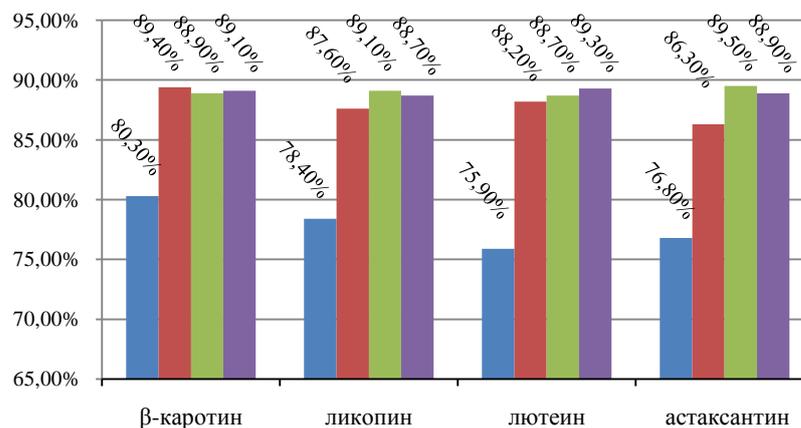


Рисунок 4 – Динамика экстрагирования каротиноидов при различной величине гидромодуля:

■ 1:5, ■ 1:10, ■ 1:15, ■ 1:20

Существенным недостатком соотношений 1:15 и 1:20 является неоправданно большой объем растворителей при крупнотоннажном производстве. При анализе полученных экспериментальных данных становится очевидным, что гидромодуль 1:5 обеспечивает выход до 80 %, а гидромодуль 1:10 позволяет осуществлять экстракцию каротиноидов на уровне около 88 %. При соотношениях сырье:экстрагент 1:15 и 1:20 наблюдается максимальная эффективность, которая составляет примерно 89 %. Принимая во внимание то, что увеличение

объема экстрагента экономически нецелесообразно, мы отдали предпочтение соотношению сырья и экстрагента – 1:10, при соблюдении числа ступеней экстракции равного 3 и базового значения времени контакта фаз – 20 мин.

На основании экспериментальных данных нами предложен *обобщенный способ получения каротиноидов*. Все виды исходного сырья предварительно сушат в сушильном шкафу при температуре 40 °С до остаточной влажности не более 15 % без доступа света с целью предотвращения процесса деструкции целевых продуктов. Подготовленное таким образом сырье измельчают до размеров частиц не более 0,5 мм, используя смешанный тип измельчения в лабораторном блендере. Далее проводят извлечение суммы каротиноидов методом многоступенчатой жидкостной экстракции, а именно: трехкратной экстракцией при температуре 20 °С, одним из растворителей – спиртом этиловым 95 %, ацетоном, хлороформом, выдерживая величину гидромодуля 1:10. Время контакта фаз на каждой ступени экстракции – 20 мин. Полученные первичные экстракты обрабатывают 4 % раствором натрия гидрокарбоната в течение 15 мин, промывают до нейтральной реакции среды по универсальному индикатору. Органические экстракты объединяют, а растворитель полностью удаляют досуха. Полученные образцы хранят в запаянных ампулах оранжевого стекла, защищая от действия света. Полученный сухой суммарный экстракт после предварительного растворения в н-гексане используют для разделения на фракции индивидуальных каротиноидов методом колоночной хроматографии. В качестве неподвижной фазы применяют оксид алюминия III степени активности, в качестве элюентов последовательно – н-гексан, смесь н-гексана и диэтилового эфира (1:1), смесь диэтилового эфира и спирта этилового 95 % (20:1). Разделение каротиноидов на колонке оценивают визуально по продвижению окрашенных зон адсорбции. Объемы элюатов фракций разделенных каротиноидов упаривают в роторном испарителе до минимального объема и хранят в запаянных ампулах, предохраняя от воздействия света.

Предложенный способ получения каротиноидов может быть использован для получения каротиноидов из любых объектов. Однако, с одной стороны, в каждом конкретном случае некоторые технологические показатели нуждаются в дополнительной оптимизации, а с другой масштабирование способа и его последующая адаптация к условиям производства также требуют уточнения некоторых параметров, т.к. их варьирование оказывает максимальное влияние на технологический выход каротиноидов и экономическую эффективность модели. К таким параметрам следует отнести температурный режим экстракции, число ступеней экстракции, время контакта фаз на каждой ступени экстракции, концентрацию раствора натрия гидрокарбоната и количество алюминия оксида, помещаемое в колонку для хроматографического разделения каротиноидов.

Индивидуальная и перекрестная оптимизация опытным путем каждого из этих параметров экономически нецелесообразна, поэтому были использованы математические методы с последующей экспериментальной апробацией расчетных результатов. Комплексную оценку влияния технологических параметров обобщенного способа получения каротиноидов на их выход осуществляли методом математического планирования эксперимента, используя построение математической модели на основе уравнения регрессии первого порядка.

Для построения математической модели в качестве переменных величин были выбраны масса алюминия оксида ( $X_1$ ), помещаемого в хроматографическую колонку, время контакта фаз на одной ступени экстракции ( $X_2$ ), концентрация раствора натрия гидрокарбоната ( $X_3$ ), число ступеней экстракции ( $X_4$ ), температурный режим экстрагирования ( $X_5$ ). Для проверки

значимости влияния этих факторов на процесс экстракции был сформирован эксперимент по типу дробной реплики (Таблица 1).

Таблица 1 – Условия планирования эксперимента

	X <sub>1</sub> , г	X <sub>2</sub> , мин	X <sub>3</sub> , %	X <sub>4</sub> , раз	X <sub>5</sub> , °C
Основной уровень	5	20	10	3	20
Интервал варьирования	2	10	5	1	5
Верхний уровень (+1)	7	30	15	4	25
Нижний уровень (-1)	3	10	5	2	15

Далее в соответствии с дробной репликой 2<sup>3</sup> был поставлен эксперимент в восьми повторностях в соответствии с общепринятой матрицей планирования. Критерием оптимизации служило количество экстрагированного каротиноида в процентах, которое определяли спектрофотометрически. На основании полученных результатов было получено опорное уравнение регрессии, имеющее следующий вид:

$$\text{для } \beta\text{-каротина: } y=0,1401-0,0034x_1-0,0001x_2-0,0024x_3+0,0004x_4+0,0016x_5 \quad (1)$$

$$\text{для лютеина: } y=0,0275-0,0004x_1-1,2 \cdot 10^{-5}x_2-0,0002x_3+8,8 \cdot 10^{-5}x_4+0,0002x_5 \quad (2)$$

$$\text{для ликопина: } y=0,0993-0,0025x_1-0,0013x_2-0,0035x_3+0,0005x_4+0,0018x_5 \quad (3)$$

$$\text{для астаксантина: } y=0,0119-0,0004x_1-2,5 \cdot 10^{-5}x_2-0,0002x_3+5,0 \cdot 10^{-5}x_4+0,0001x_5 \quad (4)$$

Как показали расчеты, коэффициенты в уравнении регрессии для первого, второго и третьего факторов имели отрицательные значения, для четвертого и пятого – положительные. Для определения значимости коэффициентов уравнения регрессии рассчитывали величину критерия Стьюдента и сравнивали расчетное значение с табличным (Таблица 2).

Таблица 2 – Результаты определения значимости коэффициентов в уравнениях регрессии

Параметр	β-Каротин	Лютеин	Ликопин	Астаксантин
t <sub>1</sub>	11,40	7,18	3,79	7,69
t <sub>2</sub>	0,44	0,21	1,89	0,48
t <sub>3</sub>	7,99	3,08	5,32	4,32
t <sub>4</sub>	1,25	1,44	0,76	0,96
t <sub>5</sub>	5,50	2,67	2,66	2,88

Коэффициенты Стьюдента для второго (t<sub>2</sub>) и четвертого факторов (t<sub>4</sub>) меньше табличного (2,57), что свидетельствует о минимальном влиянии времени контакта фаз более 10 мин и кратности экстракции более 2 ступеней на выход каротиноидов. Наибольшее положительное влияние на процесс оказывает температура (t<sub>5</sub>). Максимальное отрицательное влияние оказывает количество алюминия оксида (t<sub>1</sub>), если происходит увеличение его массы более 5 г. После учета влияния факторов уравнение регрессии приняло окончательный вид:

$$\text{для } \beta\text{-каротина: } y=0,1401-0,0034x_1-0,0024x_3+0,0016x_5 \quad (5)$$

$$\text{для лютеина: } y=0,0275-0,0004x_1-0,0002x_3+0,0002x_5 \quad (6)$$

$$\text{для ликопина: } y=0,0993-0,0025x_1-0,0035x_3+0,0018x_5 \quad (7)$$

$$\text{для астаксантина: } y=0,0119-0,0004x_1-0,0002x_3+0,0001x_5 \quad (8)$$

Для проверки адекватности построенной математической модели, используя окончательное уравнение регрессии и матрицу эксперимента, рассчитывали теоретические значения измеряемого показателя – содержание каротиноида в конечном экстракте – и значение критерия Фишера, которое составило 0,0012. Это значение не превышает табличное – F<sub>0,95</sub>(8,13) = 2,77, и поэтому можно говорить, что разработанная модель адекватна.

На следующем этапе проводили оптимизацию процесса экстракции методом крутого восхождения, параметром оптимизации служило содержание каротиноида. Начальной точкой

движения был выбран эксперимент с наилучшими результатами по содержанию каротиноида, полученный в предыдущем исследовании. Варьирование факторов проводили в соответствии с их влиянием на экстракционный процесс и с учетом величины коэффициентов для каждого фактора в окончательном уравнении регрессии. Наибольшее значение коэффициента наблюдается у первого фактора – количество алюминия оксида, шаг его варьирования был максимальным (Таблица 3).

Таблица 3 – Крутое восхождение по содержанию каротиноида в конечном экстракте

Характеристика	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	y
Начальная точка движения	3 г	10 мин	5%	2 ступени	25,0 С°	–
Единица варьирования	0,25	–	0,5	–	2,5	–
для β-каротина						
Коэффициент в уравнении регрессии	-0,0034	–	-0,0024	–	+0,0016	–
Опыт 1	2,75	10	4,5	2	27,5	0,145
Опыт 2	2,5	10	4,0	2	30,0	0,148
Опыт 3	2,25	10	3,5	2	32,5	0,141
для лютеина						
Коэффициент в уравнении регрессии	-0,0004	–	-0,0002	–	+0,0002	–
Опыт 1	2,75	10	4,5	2	27,5	0,027
Опыт 2	2,5	10	4,0	2	30,0	0,030
Опыт 3	2,25	10	3,5	2	32,5	0,025
для ликопина						
Коэффициент в уравнении регрессии	-0,0025	–	-0,0035	–	+0,0018	–
Опыт 1	2,75	10	4,5	2	27,5	0,099
Опыт 2	2,5	10	4,0	2	30,0	0,106
Опыт 3	2,25	10	3,5	2	32,5	0,095
для астаксантина						
Коэффициент в уравнении регрессии	-0,0004	–	-0,0002	–	+0,0001	–
Опыт 1	2,75	10	4,5	2	27,5	0,012
Опыт 2	2,5	10	4,0	2	30,0	0,015
Опыт 3	2,25	10	3,5	2	32,5	0,010

Для третьего и пятого факторов (концентрация раствора натрия гидрокарбоната и температура) шаг изменяли пропорционально значению их коэффициентов в уравнении регрессии. Для таких незначимых факторов, как время контакта фаз и число ступеней экстракций, принимали значения, равные минимальным – 10 мин и 2 ступени. По результатам математической оптимизации установлено, что повышение температуры выше 30 °С, уменьшение количества алюминия оксида менее 2,5 г и концентрации раствора натрия гидрокарбоната ниже 4 % не приводит к увеличению выхода каротиноида, а следовательно, результаты в опыте 2 свидетельствуют о достижении оптимальных условий. Необходимо

отметить, что выявленное количественное влияние пяти факторов на получение каротиноидов позволит в дальнейшем упростить масштабирование методики.

Полученные данные позволили предложить унифицированную технологическую схему получения индивидуальных каротиноидов (Рисунок 5).



Рисунок 5 – Унифицированная технологическая схема получения индивидуальных каротиноидов

Основная стадия технологического процесса объединяет экстракционный и хроматографический этапы получения индивидуальных каротиноидов.

Поскольку до 99 % всех природных каротиноидов содержится в зеленых частях растений, то очевидно, что следует принимать во внимание совместное присутствие каротиноидов и хлорофиллов, что обуславливает необходимость введения стадии их разделения.

В качестве модельного объекта исследования использовали фармакопейное лекарственное растительное сырье (ЛРС) – крапивы двудомной листья (*Urticae dioicae folia*), товароведческие показатели и параметры качества сырья соответствовали требованиям ГФ XIII. Для выбора условий получения фракции, содержащей хлорофиллы и каротиноиды, были проанализированы данные литературы, касающиеся способов получения извлечений из этого вида сырья. Фракционирование каротиноидов и хлорофиллов проводится, как правило, на стадии анализа методами колоночной хроматографии (КХ) или ТСХ. В связи с этим достаточно интересным представляется решение задачи по разделению каротиноидов и хлорофиллов на этапе экстракции. Предварительно перед получением суммарного экстракта, содержащего каротиноиды и хлорофиллы, и разделением этих групп БАВ были определены средние значения содержания суммы каротиноидов в листьях крапивы – около 0,035 % и хлорофиллов – около 0,360 %.

При выполнении эксперимента была предложена схема разделения каротиноидов и хлорофиллов, учитывающая обработку сырья растворителями в порядке уменьшения их полярности (Рисунок 6). Достичь полной избирательности растворителей в отношении каждого класса БАВ в процессе экстракции априори невозможно, однако частичная очистка сырья на каждом последующем этапе при применении теоретически разработанной схемы разделения очевидна. Правильность сделанных предположений в дальнейшем была подтверждена экспериментально. Из первоначальной схемы была исключена стадия обработки исходного сырья водой очищенной, т.к. профили спектров поглощения извлечений, полученных спиртом этиловым 40 %, по положению максимумов поглощения идентичны таковым для водного извлечения, что подтверждает экстракцию полярных соединений этими двумя растворителями.



Рисунок 6 – Окончательная схема получения суммарной фракции, содержащей каротиноиды и хлорофиллы

Для каждого этапа «очистки сырья» от сопутствующих соединений экспериментально было установлено время настаивания – 24 часа. В результате последовательной обработки сырья растворителями в порядке уменьшения их полярности «очищенное сырье» содержит минимальные количества полярных соединений.

Далее проводили экстракцию липофильных соединений (каротиноиды, хлорофиллы). С этой целью сырье предварительно обработали омыляющим агентом, а затем последовательно 40 % раствором спирта этилового и 70 % раствором спирта этилового. Далее заливали 6 частями экстрагента (или спирт этиловый 95 %, или ацетон, или хлороформ) из расчета 1:10 (коэффициент поглощения 1,8). Настаивали в течение 4 суток с 6 частями экстрагента, экстрагент сливали, после чего сырье заливали 2 частями растворителя, настаивали 24 ч, экстрагент сливали, а сырье повторно заливали 2 частями экстрагента вновь на сутки. Экстракты объединяли, упаривали в роторном испарителе при температуре 40 °С до объема 2 мл и подвергали разделению каротиноидов и хлорофиллов.

Извлечения, полученные экстракцией спиртом этиловым 40 % и 70 %, далее не используются в предложенной технологии.

При необходимости создания безотходного производства возможна коррекция и оптимизация технологической схемы с целью получения групп БАВ, которые экстрагируются спиртом этиловым 40 % и 70 %. Предложенная схема является унфицированной и позволяет использовать на последней стадии экстрагент, который выберет сам экспериментатор в зависимости от особенностей и исходного сырья и его химического состава, а также полярности получаемого каротиноида. В связи с этим экстрагент последней стадии представлен на усмотрение технолога: либо спирт этиловый 95 %, либо хлороформ, либо ацетон. Такая «относительность» в выборе растворителя хотя и нетрадиционна, но дает возможность другому исследователю или производителю в дальнейшем выбрать тот экстрагент, который имеет максимальное сродство к доминантному каротиноиду в сырье. Анализ полученного модельного экстракта из крапивы двудомной листьев показал среднее содержание каротиноидов около 0,0276 %, хлорофиллов – 0,3041 %. Далее была предложена схема разделения после суммарной липофильной фракции (Рисунок 7).



Рисунок 7 – Схема разделения каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов (\*ПЭ – петролейный эфир, \*\*СЭ – спирт этиловый)

Суммарное извлечение после сгущения под вакуумом до минимального объема, растворяли в петролейном эфире и переносили в делительную воронку №1, встряхивая до полного растворения. Поскольку хлорофиллы и ксантофиллы являются более полярными соединениями, чем каротины, и способны экстрагироваться спиртом этиловым 95 %, к петролейноэфирному раствору прибавляли 25 мл этого растворителя, а для четкого разделения фаз в систему добавляли 2,5 мл воды очищенной. Оптимальное время экстракции, которого

достаточно для полного перехода ксантофиллов и хлорофиллов в спирт, составляет 30 мин. Профили спектров поглощения спиртовой фазы показывают, что в этот растворитель из петролейного эфира экстрагировались ксантофиллы (максимумы поглощения оптической плотности в диапазоне от 390 до 480 нм) и хлорофиллы (максимумы поглощения в интервале от 550 до 700 нм). Через 30 мин и после полного разделения системы спиртовую фазу, содержащую ксантофиллы и хлорофиллы, отделяли от петролейного эфира и переносили в другую делительную воронку (делительная воронка №2). Процедуру повторяли до получения практически бесцветного спиртового слоя в делительной воронке №1. Далее спиртовые извлечения объединяли в делительной воронке №2. Петролейноэфирная фракция, оставшаяся в делительной воронке №1, предположительно содержит каротины и следы хлорофиллов. Чтобы отделить каротины от следовых количеств хлорофиллов, следует провести гидрофильное омыление, а затем осуществить экстракцию спиртом этиловым.

В качестве омыляющего агента использовали 20 % раствор гидроксида натрия, т.к. известно, что этот реагент полностью омыляет хлорофиллы листьев крапивы. С этой целью в делительную воронку №1 добавляли 10 мл 20% раствора натрия гидроксида и 25 мл спирта этилового 95 %, смесь встряхивали в течение 30 мин и после расслоения спиртовую фазу, содержащую продукты омыления хлорофиллов, сливали. Фракция петролейного эфира окрашена в ярко желто-оранжевый цвет, а спиртовая фаза имеет зеленую окраску за счет содержания хлорофиллов. Характер спектра поглощения петролейноэфирной фракции подтвердил содержание в ней каротинов. Среднее содержание каротинов, извлеченных из листьев крапивы, в пересчете на 0,0002 % раствор СО  $\beta$ -каротина в петролейном эфире составляет 7,80 мг%.

Разделение компонентов объединенной спиртовой фракции, находящейся в делительной воронке №2, проводили с учетом свойств ксантофиллов и хлорофиллов. Хлорофиллы являются менее полярными веществами, чем ксантофиллы, поэтому остатки хлорофиллов будут экстрагироваться петролейным эфиром, а ксантофиллы останутся в спиртовой фазе. В связи с этим к объединенному спиртовому экстракту приливали 25 мл петролейного эфира и раствор встряхивали 30 мин. Разделение ксантофиллов и хлорофиллов подтверждается измерением спектров поглощения фракций после расслоения фаз: положение максимума поглощения петролейноэфирной фракции при 667 нм свидетельствует о том, что в этот растворитель переходят следовые количества хлорофилла, а спектр поглощения спиртовой фракции имеет профиль, характерный для ксантофиллов (при 422, 445 и 474 нм). Содержание ксантофиллов в пересчете на 0,0002% раствор СО лютеина в спиртовой фазе в среднем составляет 2,090 мг%.

Все эти факты свидетельствуют о том, что предложено экстракционное разделение каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов при их совместном присутствии в растительном сырье.

Учитывая особенности локализации и биотрансформации астаксантина в природных источниках животного происхождения, мы осуществили некоторую детализацию способа получения каротиноидов применительно к «животным каротиноидам» на примере астаксантина. При экстракции астаксантина и его эфиров как правило, происходит одновременное извлечение всей липофильной фракции сырья. В связи с этим необходима конкретизация общей технологической схемы, представленной на рисунке 5, в частности стадии ТП 3. В качестве исходного сырья были выбраны панцири креветок как наиболее доступное сырье со средним содержанием астаксантина до 15 мг%.

Свободный астаксантин можно отделить от его эфиров и других сопутствующих липофильных соединений, последовательно используя в качестве экстрагентов растворители с

резко отличающимся значением диэлектрической проницаемости. На этапе предварительных исследований в качестве полярных растворителей были апробированы ацетон и спирт этиловый 95%, а из неполярных – хлороформ и н-гексан. В качестве неполярного экстрагента использован н-гексан, полярного – спирт этиловый 95%, т.к. разница в значениях диэлектрической проницаемости для этой пары растворителей максимальная. Первичным экстрагентом служил ацетон, который позволяет получить суммарный экстракт как свободных каротиноидов, так и их эфиров (Рисунок 8).



Рисунок 8 – Общая схема получения ксантофиллов из сырья животного происхождения

Далее суммарный экстракт сгущается в роторном испарителе до минимального объема, после чего остаток обрабатывается смесью н-гексана и спирта этилового 95 % в соотношении 1:1, что приводит к образованию двух фаз: спиртовой (фракция а), содержащей более полярный несвязанный астаксантин, и гексановой (фракция б), содержащей эфиры ксантофиллов и жирные кислоты. Измерение спектра поглощения спиртовой фракции показало наличие максимума поглощения при 478 нм, что характерно для свободного астаксантина.

Технологическая особенность получения каротиноидов из сырья животного происхождения заключается в необходимости введения стадии омыления сложных эфиров, в виде которых каротиноиды находятся в этом сырье. Омылению подвергается сам экстракт, и для этих целей предлагается использовать 10 % раствор калия гидроксида, поскольку основные свойства у него выражены сильнее, чем у 4 % раствора натрия гидрокарбоната. Кроме того,

необходимо более длительное воздействие щелочного агента на гексановую фракцию, содержащую эфиры жирных кислот, в связи с чем предлагается двухчасовая экспозиция. После проведения омыления эфиров водно-спиртовой раствор разбавляют водой до реакции среды, близкой к нейтральной по универсальному индикатору, а свободный астаксантин и сопутствующий ему кантаксантин извлекают н-гексаном. Завершающей стадией является операция разделения сконцентрированных в роторном испарителе фракции (а) и фракции (в) методом КХ. После разделения фракций (а) и (в) на колонке с алюминия оксидом спектрофотометрически установлено содержание астаксантина, которое в среднем составило 11,1 мг%. Экспериментальные данные согласуются с теоретическими, т.к. предложенная схема позволяет получать астаксантин из сырья животного происхождения.

Таким образом, теоретически обоснован и экспериментально подтвержден способ получения субстанций каротиноидов из источников растительного и животного происхождения. Научная новизна предложенного подхода подтверждена патентами РФ №2648452 «Способ получения каротиноидов» и патентом РФ №2659165 «Способ разделения каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов листьев крапивы двудомной».

Положительный результат функции блока А1 (Рисунок 3) – получение субстанций каротиноидов-маркеров ( $\beta$ -каротина, ликопина, лютеина, астаксантина) и предложенная технология их получения – может быть учтен в процессе построения обобщенной IDEF0 методологии создания ЛФ на основе каротиноидов.

#### **Разработка методологии аналитического сопровождения технологии получения фармацевтических субстанций каротиноидов**

В соответствии с IDEF0-моделью дизайна исследования (Рисунок 3, блок А2) на следующем этапе следовало провести всестороннее аналитическое исследование полученных субстанций. Эта часть работы является необходимой и связующей между получением субстанций каротиноидов (Рисунок 3, блок А1) и их стабилизацией и получением оптимальной ЛФ (Рисунок 3, блок А3). Кроме того, основной планируемый результат – общие аналитические подходы к анализу каротиноидов – является значимым компонентом обобщенной IDEF0 методологии.

С учетом теоретических и экспериментальных достижений в исследовании природных соединений нами был проведен анализ трех лабораторных серий каждого полученного каротиноида физико-химическими методами:  $^1\text{H}$ -ЯМР, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии, спектрофотометрии в УФ- и видимой области, а также ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ.

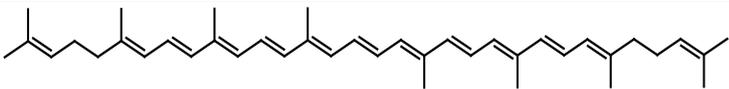
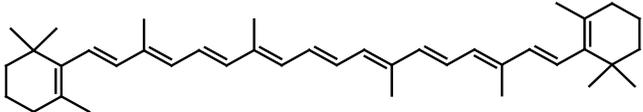
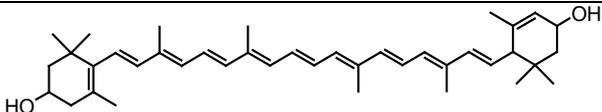
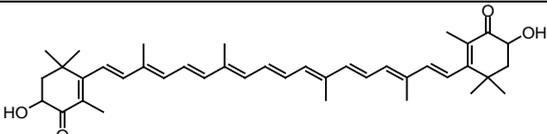
Идентификация методом  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии осуществлялась в два этапа: вначале соотносили сигналы характерные для полиеновой цепи, а на втором этапе анализировали сигналы, характерные для концевых групп. Окончательное установление структуры по характерным сигналам проводили по базе данных <http://sdb.sdb.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), что позволило идентифицировать полученные субстанции как  $\beta$ -каротин, ликопин, лютеин и астаксантин в транс-конфигурации.

Методом масс-спектрометрии подтверждена подлинность полученных каротиноидов с применением многоступенчатого анализа полученных сигналов. Так, при отщеплении у  $\beta$ -каротина молекулярного иона с массой 92 образуется фрагмент 444, что характерно и для  $\alpha$ -каротина,  $\gamma$ -каротина. Однако для таких изомеров  $\beta$ -каротина, как  $\alpha$ -каротин,  $\gamma$ -каротин и ликопин присуще образование иона 467, что не свойственно  $\beta$ -каротину. Поэтому отсутствие этого «осколка» в масс-спектре образца  $\beta$ -каротина дополнительно подтверждает его подлинность. Вместе с этим подлинность ликопина доказывает наличие иона 467 в масс-

спектре образца. Кроме того, как для  $\beta$ -каротина так и для ликопина, являющихся структурными изомерами, был определен молекулярный ион 69. При этом фрагментация иона 69 с образованием «осколка» 41 характерна только для ликопина, что может быть маркерным для этого соединения. Для лютеина потеря конечного фрагмента приводит к образованию иона 441. Следует отметить, что по данным литературы его изомер – зеаксантин такой фрагмент не образует. Для лютеина является показательным образование каскада молекулярных ионов в интервале 392 – 324 в результате дефрагментации углеродной цепи. Подобный процесс не наблюдается с его изомером – зеаксантином. Для астаксантина характерным следует признать образование «каскада осколков» в интервале 389 – 297, который возникает в результате последовательного отщепления фрагментов  $C_3H_4$  и  $C_2H_2$ . Результаты эксперимента подтверждают, что метод масс-спектрометрии позволяет проводить идентификацию каротиноидов, которая значима с точки зрения их «внутриклассовой» изомерии.

Результаты анализа полученных субстанций методом ИК-спектроскопии в интервале 4000 – 400  $cm^{-1}$  представлены в сводной таблице 4.

Таблица 4 – Характеристические полосы поглощения полученных каротиноидов

Название и формула каротиноида	Полосы поглощения, $cm^{-1}$
 Ликопин	3026, 2958, 2902, 2859, 1454 ( $CH_3$ , $CH$ ); 1628, 1562, 826 ( $C=C$ ); 960 ( $CH=CH$ – <i>транс</i> -изомер)
 $\beta$ -Каротин	3020, 2950, 2910, 2852, 1450 ( $CH_3$ , $CH$ ); 1625, 1560, 830 ( $C=C$ ); 966 ( $CH=CH$ – <i>транс</i> -изомер)
 Лютеин	3400 ( $-OH$ ); 3395, 1048 ( $C-O$ ); 3018, 2960, 2910, 2900, 1455 ( $CH_3$ , $CH$ ); 1628, 1562, 825 ( $C=C$ ); 960 ( $CH=CH$ – <i>транс</i> -изомер)
 Астаксантин	3490 ( $OH$ ); 1076 ( $C-O$ ); 1652 ( $C=O$ ); 3020, 2990, 2910, 2950 ( $CH_3$ , $CH$ ); 1568, 830 ( $C=C$ ); 990 ( $CH=CH$ – <i>транс</i> -изомер)

Полученные нами данные показывают, что в спектрах всех образцов присутствуют полосы, обусловленные наличием полиеновой цепи. Для четырех полученных субстанций характерно наличие выраженной полосы при 960  $cm^{-1}$  и слабой полосы в интервале от 825 до 830  $cm^{-1}$ , что свидетельствует о преимущественно трансoidalной форме каротиноидов. В пользу этого утверждения дополнительно свидетельствует наличие полос около 1600  $cm^{-1}$  слабой и средней интенсивности и отсутствие поглощения при 800-750  $cm^{-1}$ . Отсутствие в спектрах образцов полосы поглощения при 690  $cm^{-1}$  характерного для спектров *цис*-изомеров и дополнительно подтверждает трансoidalную форму полученных образцов каротиноидов. В структурах ксантофиллов, помимо полиенового фрагмента, присутствуют кислородсодержащие функциональные группы: гидроксигруппы ( $-OH$ ) лютеина проявляются в области 3400  $cm^{-1}$ , у астаксантина, кроме  $OH$ -групп, наблюдаются характеристические частоты для групп  $C=O$  и  $C-O$  – при 1650  $cm^{-1}$  и 1060  $cm^{-1}$ . Таким образом, метод ИК-спектроскопии может использоваться для идентификации и каротинов, и ксантофиллов.

Спектрофотометрия в УФ- и видимой областях, как наиболее доступный метод, не теряет своей значимости в анализе каротиноидов.

Для регистрации электронных спектров в интервале длин волн от 300 до 700 нм готовили растворы полученных субстанций  $\beta$ -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина с концентрацией около 0,0002 % в н-гексане, петролейном эфире, хлороформе, ацетоне, спирте этиловом 95 %. Растворы образцов  $\beta$ -каротина в н-гексане, ацетоне, хлороформе имеют следующие максимумы полос поглощения: 426, 448, 476 нм, 430, 454, 479 нм и 434, 461, 484 нм соответственно. Для спектров поглощения растворов ликопина характерны максимумы полос поглощения при 442, 470, 504 нм (н-гексан); 458, 486, 517 нм (хлороформ); 446, 472, 505 нм (ацетон). Лютеин в н-гексане характеризуется тремя максимумами при 419, 445, 472 нм, в хлороформе – 436, 460, 483 нм, в спирте этиловом 95% – при 423, 444, 474 нм. В спектре астаксантина в хлороформе проявляется полоса поглощения с максимумом при 487 нм, в ацетоне – 481 нм, в н-гексане – 468 нм.

Результаты анализа образцов методом спектрофотометрии в УФ- и видимой области подтвердили, что в эксперименте получены субстанции  $\beta$ -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина. Хотя УФ-спектрофотометрия не является высокоспецифичным методом, однако она – максимально доступный метод, поэтому с целью повышения ее специфичности и достоверности спектры поглощения образцов каротиноидов следует регистрировать в нескольких растворителях с различной полярностью. Известно также, что поскольку использование в работе стандартных образцов (СО) каротиноидов значительно повышает достоверность анализа, то в таком случае будет достаточным измерение спектра поглощения образца каротиноида только в одном из приемлемых для него растворителей. Одним из способов повышения специфичности анализа каротиноидов этим методом можно считать расчет отношения интенсивности поглощения третьего максимума ко второму (III/II) в процентах (Таблица 5).

Таблица 5 – Табличные и расчетные значения отношения III/II

Каротиноид	Данные литературы (III/II), %	Данные для расчета*			Расчетное значение (III/II), %
		A <sub>III</sub>	A <sub>II</sub>	A <sub>min</sub>	
$\beta$ -Каротин	25 (н-гексан)	0,1462	0,1650	0,1400	24,8
Ликопин	65 (петролейный эфир)	0,5220	0,5871	0,4030	64,6
Лютеин	60 (н-гексан)	0,5410	0,6200	0,4250	59,5

\* – среднее значение после шести определений, обработанные статистически ( $p=0,95$ )

Значения отношения III/II дополнительно подтверждают подлинность и чистоту субстанций каротиноидов, полученных по предложенной технологической схеме.

ТСХ-анализ субстанций каротиноидов был проведен для следующих подвижных фаз (ПФ): н-гексан – ацетон (6:2) – I; петролейный эфир – диэтиловый эфир – кислота уксусная (85:15:1) – II; диэтиловый эфир – петролейный эфир (3:1) – III; петролейный эфир – н-гексан (10:1) – IV (Таблица 6).

Таблица 6 – Результаты ТСХ-анализа образцов субстанций каротиноидов

Каротиноид	Подвижная фаза/фактор удерживания (R <sub>f</sub> *)			
	I	II	III	IV
$\beta$ -Каротин	0,97	0,75	0,77	0,03
Ликопин	0,80	0,67	0,66	0,06
Лютеин	0,37	0,62	0,63	0,18
Астаксантин	0,04	0,12	0,37	0,04

\* – данные получены для трех параллельных определений

Анализ треков каротиноидов показал, что на всех хроматограммах зоны адсорбции, соответствующие  $\beta$ -каротину, окрашены в оранжевый цвет, ликопину – в оранжево-красный, лютеину – в ярко-желтый, астаксантину – в ярко-красный. После обработки хроматограмм 10 % раствором фосфорномолибденовой кислоты и нагревания до 60°C все зоны адсорбции проявлялись в виде синих пятен на зелено-желтом фоне. Для каждого экспериментального образца каротиноида рассчитан относительный фактор удерживания, который находился в интервале 0,99 – 1,01, что подтвердило идентичность полученных каротиноидов и СО  $\beta$ -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина. Анализ каротиноидов методом ТСХ является специфичным методом, и может использоваться в анализе ЛФ, содержащих эти БАВ. Применение СО увеличивает специфичность, поэтому разработанные хроматографические условия идентификации субстанций каротиноидов методом ТСХ с использованием СО каротиноидов были в дальнейшем применены в анализе зарегистрированного в РФ ЛС с каротиноидами – облепихового масла.

В связи с тем что в технологии получения субстанций каротиноидов использовались органические растворители, контроль на их остаточное содержание обязателен. Он был проведен методом ГЖХ (Таблица 7).

Таблица 7 – Содержание остаточных органических растворителей в полученных субстанциях каротиноидов\*

Растворитель, %	$\beta$ -Каротин	Ликопин	Лютеин	Астаксантин
Спирт этиловый 95 %	0,097	0,110	0,100	0,095
Ацетон	0,048	0,039	0,042	0,044
Хлороформ	0,004	0,003	0,017	0
н-Гексан	0,023	0,021	0	0,057

\* – среднее значение после шести определений, обработанные статистически ( $p=0,95$ )

Данные таблицы 7 свидетельствуют о том, что содержание всех четырех органических растворителей не превышает допустимую норму в соответствии с ГФ XIII – менее 0,5%, что подтверждает высокую степень чистоты готового продукта и адекватность предложенной технологии получения.

Анализ полученных субстанций каротиноидов методом ВЭЖХ показал, что по предложенной технологической схеме можно получить субстанции каротиноидов со степенью чистоты, превышающей 99 % (Рисунок 9).

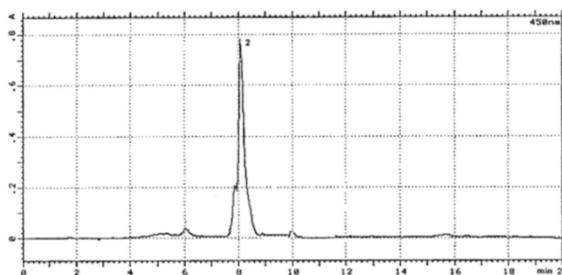


Рисунок 9 – Хроматограмма полученной субстанции ликопина, по предлагаемой методике, чистота 99,7 %

Количественное определение каротиноидов в полученных субстанциях провели оптимальными методами УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ. (Таблица 8).

Таблица 8 –Количественное содержание каротиноидов в субстанциях

Каротиноид	Содержание каротиноида в субстанции*, %	
	метод УФ-спектрофотометрии	ВЭЖХ
β-Каротин	99,62	99,70
Ликопин	99,67	99,73
Лютеин	99,64	99,69
Астаксантин	99,68	99,71

\* – среднее значение после шести определений, обработанные статистически (p=0,95)

Результаты определения количественного содержания активного вещества в полученных субстанциях методом ВЭЖХ коррелируют с данными спектрофотометрического анализа.

Обобщенная методология аналитического сопровождения технологии получения субстанций каротиноидов на примере β-каротина, ликопина, лютеина и астаксантина представлена на рисунке 10.



Рисунок 10 – Методология аналитического сопровождения технологии получения субстанций каротиноидов

Приоритетными методами доказательства структуры выделенных каротиноидов можно считать, прежде всего, ЯМР и масс-спектрометрию.

Поскольку каротиноиды характеризуются значительной внутриклассовой изомерией, то исследователь должен располагать максимально полной информацией о геометрической конфигурации полученной субстанции каротиноида, чтобы в дальнейшем сделать достоверный вывод о связи структура-активность каротиноида. Такие экспериментальные данные можно получить с помощью ЯМР-анализа. Очевидно, что принимая во внимание внутриклассовую

изомерию каротиноидов, определение только лишь их молекулярной массы методом масс-спектрометрии для идентификации будет недостаточным. В связи с этим мы предлагаем применять сравнительный многоступенчатый анализ молекулярных ионов с идентификацией «осколков», характерных для каждого индивидуального каротиноида.

ИК-спектроскопия является одним из специфичных и надежных методов подтверждения наличия функциональных групп, а в сочетании с ЯМР и масс-спектрометрией позволяет достоверно доказывать структуру полученного каротиноида.

В настоящее время спектрофотометрия в УФ- и видимой области является незаменимым методом анализа при проведении предварительных испытаний и в ходе контроля за процессом получения каротиноидов. Применение спектрофотометрии оправдано как с позиций аппаратной доступности, так и объема информации, который она позволяет получить. Безусловным повышением специфичности анализа каротиноидов этим методом является использование СО, а также регистрация спектров в нескольких разнополярных растворителях. Повысить достоверность эксперимента также позволяет расчет отношения интенсивности оптической плотности в третьем максимуме ко второму в процентах (Ш/II, %).

К группе высокоспецифичных методов анализа БАВ, в том числе и каротиноидов, относятся хроматографические методы ТСХ и ВЭЖХ, которые могут быть применены для подтверждения подлинности и чистоты каротиноидов. В исследовании каротиноидов ГЖХ применима только для контроля остаточных органических растворителей. Количественное содержание каротиноида следует определять методами ВЭЖХ и спектрофотометрии в УФ- и видимой областях.

Для доказательства структуры каротиноидов мы считаем наиболее оптимальным сочетание методов ЯМР, масс-спектрометрии и ИК-спектрокопии; для определения подлинности целесообразно использовать ИК-спектроскопию, спектрофотометрию в УФ- и видимой областях, ТСХ, ВЭЖХ; контроль содержания остаточных органических растворителей проводить методом ГЖХ. Для количественного определения приоритетными являются спектрофотометрия в УФ- и видимой областях, ВЭЖХ с применением СО каротиноидов.

Результаты комплексного аналитического изучения полученных субстанций каротиноидов далее были апробированы и применены при стабилизации каротиноидов, а также в анализе ЛС промышленного производства, содержащего каротиноиды.

Общий подход к выбору методов анализа каротиноидов как класса БАВ представлен как выход блока А2 (Рисунок 3) и одновременно как входы для блоков А3 и А4, что подтверждает логическую связь этапов эксперимента. Кроме того, после трансформации этих объектов в пределах функций А3 и А4 (Рисунок 3) они могут стать значимой частью IDEF0-модели создания ЛФ с каротиноидами.

### **Разработка технологии стабилизации субстанций каротиноидов и получение лекарственной формы на их основе**

В соответствии с дизайном практического модуля исследования в нотации IDEF0 были проведены дальнейшие экспериментальные исследования по обоснованию способа стабилизации субстанций каротиноидов и выбору оптимальной ЛФ на примере  $\beta$ -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина, что закреплено функцией блока А3 (Рисунок 3).

Основным фармакофором каротиноидов является полиеновая цепь, обуславливающая их высокую степень ненасыщенности и биологическую активность. Однако в процессе получения, очистки и хранения структура каротиноидов интенсивно подвергается изомеризации, окислению и деструкции. Такая особенность значительно затрудняет широкое использование

этой группы БАВ в практической медицине в составе ЛС. Выбор метода «технологической защиты» этого класса соединений предполагает использование таких методов и приемов, которые одновременно обеспечат как стабилизацию каротиноидов, так и сохранность их структуры в процессе получения ЛФ, включая промежуточный технологический продукт. Одной из основных задач микрокапсулирования является повышение стабильности инкапсулируемого материала, однако применение такого прогрессивного технологического приема стабилизации в отношении каротиноидов крайне ограничено.

Выбор метода микрокапсулирования осуществлен нами с учетом минимального термического и механического воздействия на исходные субстанции каротиноидов, минимального числа технологических стадий, физико-химических свойств инкапсулируемых веществ, природы полимера, его технологических показателей и ценовой доступности, привлекательности аппаратного оснащения. В связи с тем что микрокапсулы с каротиноидами в фармацевтической отрасли ранее не были получены, то в эксперименте следовало использовать вспомогательные вещества (ВВ), проверенные многолетним опытом применения как в научном эксперименте, так и в процессе производства. В связи с этим в качестве полимерной оболочки микрокапсул выбран природный полимер белковой природы – желатин марки МК, который допущен к применению в фармацевтическом производстве.

В эксперименте были изучены следующие способы микрокапсулирования: простая коацервация, экструзия и диспергирование в несмешивающихся жидкостях.

В процессе апробации простой коацервации на основании собственных исследований нами было установлено, что оптимальным для работы является 10 % раствор желатина, поэтому дальнейший эксперимент проводили с этой концентрацией полимера. Поскольку процесс получения микрокапсул с каротиноидами изучался нами впервые, то были апробированы все типы солей-осадителей и возможные варианты концентраций их растворов: 5 %, 10 %, 20 % растворы сульфатов натрия, калия, аммония, 5 %, 10 %, 20 % растворы ацетатов натрия, калия, аммония и 5 %, 10 %, 20 % растворы хлоридов натрия, калия, аммония.

Кроме выбора оптимальной соли-осадителя и концентрации ее раствора, изучалось соотношение полимер:каротиноид – полимер:соль. Традиционно при получении микрокапсул простой коацервацией используется соотношение 1:1. Так как возможность получения микрокапсул с каротиноидами изучалась нами впервые, то были опробованы три соотношения полимер:каротиноид – полимер:соль: 2:1, 1:1, 1:2. Предварительно было выбрано приемлемое соотношение полимер:каротиноид, которое составило 1:1, что и было далее использовано в эксперименте.

Установлено, что ацетаты и хлориды натрия, калия и аммония не приводят к образованию микрокапсул ни с одним из изучаемых каротиноидов. Соль, которая вызывает образование микрокапсул со всеми четырьмя каротиноидами, – это 20 % раствор натрия сульфата. Раствор калия сульфата способствовал микрокапсулированию трех из четырех каротиноидов –  $\beta$ -каротина, ликопина и лютеина, а сульфат аммония – двух из четырех:  $\beta$ -каротина и ликопина. Поэтому оптимальной солью-осадителем для изученных каротиноидов следует считать 20 % раствор натрия сульфата. Сравнение полученных микрокапсул по технологическим показателям и процента включения действующих компонентов в микрокапсулы показал, что, несмотря на промывание изобутиловым спиртом, для всех полученных микрокапсул наблюдается агрегация, а максимальная инкапсуляция каротиноидов находится на уровне 69 %, что в комплексе с неудовлетворительными технологическими характеристиками микрокапсул явилось причиной отказа от этого способа микрокапсулирования.

Учитывая термолабильность каротиноидов, мы провели конструирование микрокапсул экструзией без нагревания, позволяющей микрокапсулировать биологический материал.

Так как получение микрокапсул с каротиноидами способом экструзии проводилось впервые, то были исследованы концентрации желатина в пределах от 20 % до 50 %. Данные эксперимента показали, что получение микрокапсул возможно из 30 % и 40 % растворов полимера, причем формирование микросфер происходит под действием обоих отверждающих агентов: 0,2 М раствора кальция хлорида или в результате охлаждения раствора полимера до +5 °С. Анализ технологических характеристик полученных микрокапсул показал, что неоднородные по форме микрокапсулы получены из 30 % раствора желатина. Применение 40 % раствора полимера обеспечивает получение частиц округлой формы.

Основной технологической проблемой при получении микрокапсул экструзией является липофильность каротиноидов. Около 30% капсул, полученных в эксперименте этим способом, оказались «пустыми», т.е. включение каротиноидов нельзя считать равномерным. Для получения суспензии с равномерным распределением каротиноида по всей массе пленкообразователя необходимо интенсивное перемешивание смеси в процессе диспергирования, а это может быть причиной изомеризации каротиноида. По нашему мнению, при оптимизации технологической операции «Диспергирование каротиноида в среде пленкообразователя» именно данная стадия будет «максимально критической точкой» при адаптации технологической схемы для нужд производства.

Следующий способ, который был апробирован для микрокапсулирования каротиноидов, – это диспергирование в несмешивающейся жидкости. Собственные исследования различных серий микрокапсул показали, что наиболее удачными с технологических позиций были микрокапсулы, полученные с применением 30 % раствора пленкообразователя желатина, глицерина как пластификатора и изопропанола для промывания микрокапсул. Принимая во внимание то, что каротиноиды – светочувствительные соединения, мы в оболочку микрокапсул дополнительно включили «замутнитель» – оксид титана (IV) в концентрации 0,2 % от желатиновой массы.

В процессе разработки оптимальной прописи микрокапсул с каротиноидами и условий их получения были изучены следующие факторы, влияющие на их структурно-технологические характеристики: количество пластификатора, природа несмешивающейся жидкости, температура, при которой происходит образование микрокапсул, соотношение несмешивающихся фаз. При планировании эксперимента учитывали количество пластификатора от 1,5 до 6,0 %. Получены серии микрокапсул в различных несмешивающихся жидкостях: масло подсолнечное, масло оливковое, масло вазелиновое с соотношением полимер:масло – 1:2, 1:3 и 1:5. Оптимальным оказалось 3,0 % содержание пластификатора в оболочке. Сравнение технологических характеристик, гранулометрического состава микрокапсул, сыпучести и насыпной массы микрокапсул позволили определить условия микрокапсулирования каротиноидов: дисперсионная среда – масло подсолнечное, соотношение полимер:масло – 1:3, температура – 40 °С.

На основании проведенных исследований разработан и предложен следующий состав микрокапсул на 100 г готового продукта, а также рассчитаны нормы загрузки с учетом 3 % потерь: каротиноид – 2,580; желатин – 30,90; вода очищенная – 66,21; глицерин – 3,090; оксид титана (IV) – 0,206; твин-80 – 0,021. Обобщенная традиционная схема производства микрокапсул представлена на рисунке 11.

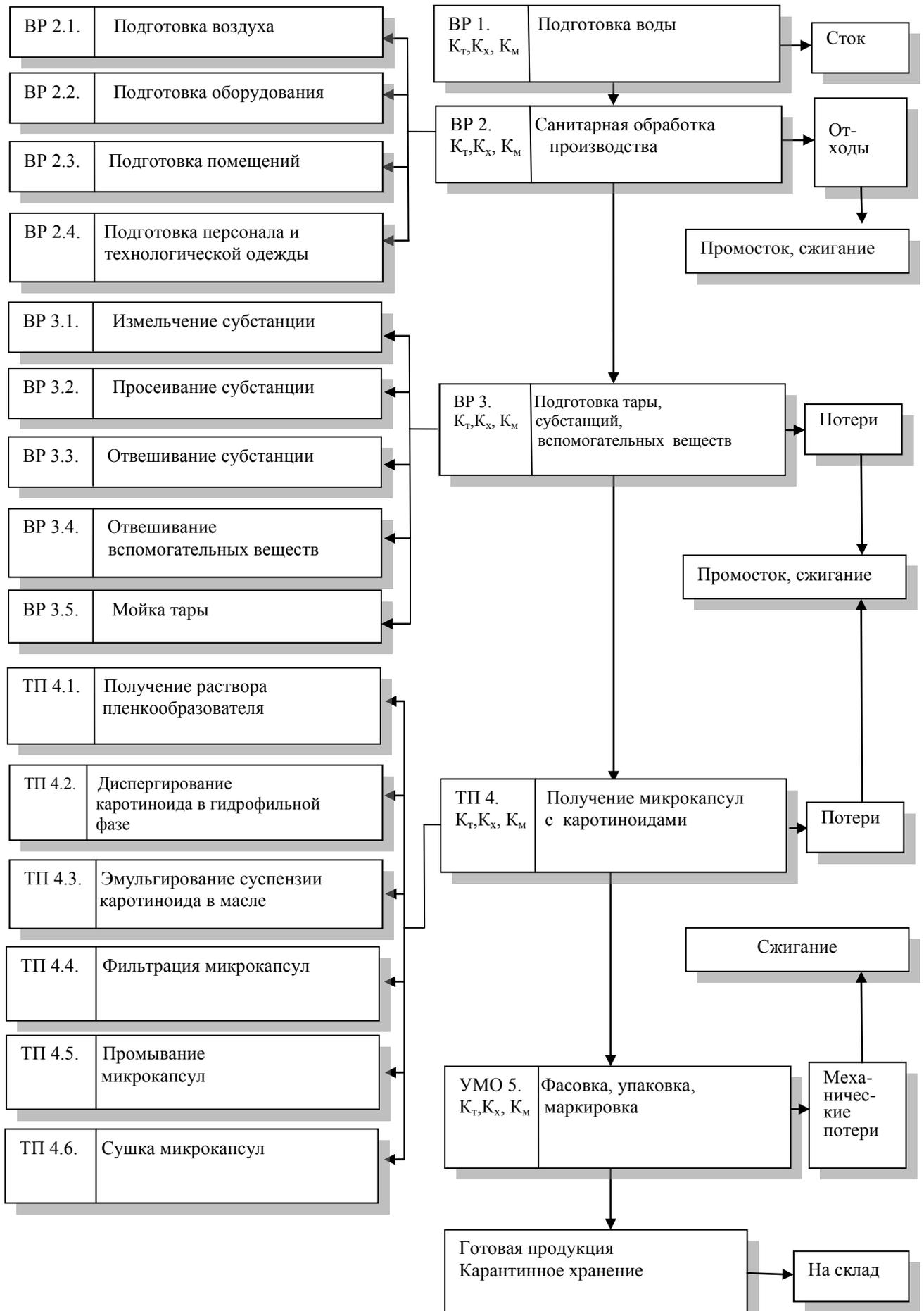


Рисунок 11 – Технологическая схема получения микрокапсул с каротиноидами  
 K<sub>T</sub>, K<sub>X</sub> и K<sub>M</sub> – технологический, химический и микробиологический контроль

В целом сконструированная технологическая схема традиционна: вспомогательные операции должны выполняться в рамках обычных технологических мероприятий.

Основной технологический процесс состоит из шести взаимосвязанных позиций: получение 30 % раствора желатина; диспергирование субстанции одного из четырех предлагаемых каротиноидов с эмульгатором Твином-80 в растворе пленкообразователя; эмульгирование суспензии каротиноида в подсолнечном масле; отделение микрокапсул от дисперсионной среды при помощи набора сит, в частности с диаметром пор 1,0 мм; промывание микрокапсул изопропиловым спиртом и сушка при комнатной температуре в течение 7-8 ч. Завершающей является стадия фасовки готовых микрокапсул в широкогорлые флаконы темного стекла, их упаковка и маркировка.

Поскольку основная цель, в соответствии с которой разрабатывались условия заключения каротиноидов в микрокапсулы, – это стабилизация индивидуальных каротиноидов, то далее по разработанной нами схеме проведено сравнительное изучение стабильности микрокапсулированных субстанций каротиноидов и без включения их в микрокапсулы (Таблица 9). Отбор проб для анализа осуществляли с частотой, регламентированной ГФ XIII для естественных условий хранения.

Таблица 9 – Матрица сравнительного изучения стабильности каротиноидов

Температура хранения – 25 °С							
отсутствие воздействия света				хранение на свету			
микро-капсулированные субстанции каротиноидов		субстанции каротиноидов без включения в микрокапсулы		микро-капсулированные субстанции каротиноидов		субстанции каротиноидов без включения в микрокапсулы	
флаконы темного стекла	флаконы прозрачного стекла	флаконы темного стекла	флаконы прозрачного стекла	флаконы темного стекла	флаконы прозрачного стекла	флаконы темного стекла	флаконы прозрачного стекла
1 А	1 Б	1 В	1 Г	2 А	2 Б	2 В	2 Г

Группы 1А и 1Б для всех четырех микрокапсулированных каротиноидов на протяжении двух лет показали содержание каротиноида до 100 %. При хранении без доступа света всех четырех нативных каротиноидов (группы 1В и 1Г) содержание действующего вещества после первого года хранения соответствовало исходному значению, однако после первого года испытаний содержание каротиноидов снизилось до 98%, на основании чего можно констатировать их стабильность в пределах года. При хранении микрокапсулированных каротиноидов на свету (группы 2А и 2Б) зафиксирована их стабильность в течение двух лет, что можно считать положительным результатом, т.к. метод «технологической защиты» этих БАВ обеспечил сохранность субстанций при хранении в «экстремальных» для каротиноидов условиях на уровне данных групп 1А и 1Б – хранение без доступа света. Отдельного внимания заслуживает результат по группам 2В и 2Г, в которых испытанию подвергались нативные субстанции. Как и предполагалось, хранение на свету для нативных каротиноидов не приемлемо. Образцы групп 2В и 2Г показали стабильность лишь в течение трех месяцев. Из этих двух групп ожидаемо наименьшую стабильность проявили образцы группы 2Г, т.е. нативные субстанции, хранившиеся на свету, во флаконах прозрачного стекла.

Эксперимент подтвердил наше предположение о том, что микрокапсулирование повысит стабильность субстанций каротиноидов и может использоваться как способ стабилизации

каротиноидов. Результаты эксперимента позволяют рекомендовать условия хранения для микрокапсулированных каротиноидов, а именно в таре темного стекла или непрозрачной таре без доступа света.

Логичным использованием полученных микрокапсул с каротиноидами является получение ЛФ на их основе. Наиболее простой и уже применяемой ЛФ для каротиноидов, исключающей механическое и температурное воздействия на них в процессе ее получения, являются капсулы. Позитивным моментом для разработки этого направления является заключение микрокапсул в желатиновые непрозрачные капсулы, что дополнительно повысит фотостабильность каротиноидов и изолирует их от других факторов внешней среды.

Фактически разработка традиционной технологической схемы получения капсул с микрокапсулами каротиноидов – это совмещение технологии получения микрокапсул и их капсулирования. За основу технологии капсул было взято получение микрокапсул. Дополнительной частью основного технологического процесса стала стадия включения микрокапсул в капсулы. Типичная схема производства капсул с микрокапсулами каротиноидов включает три технологических этапа: вспомогательные работы, основной технологический процесс и упаковку, маркировку готового продукта. Подготовительные работы представлены, как обычно, тремя группами взаимосвязанных мероприятий и дополнены подготовкой капсул. Основной технологический процесс состоит из двух фрагментов: получение микрокапсул с каротиноидами (или  $\beta$ -каротином, или ликопином, или лютеином, или астаксантином) и получение капсул с микрокапсулами каротиноидов. Последний этап объединяет три вида операций: просеивание сухих микрокапсул для их равномерного фракционирования; наполнение и запечатывание твердых желатиновых капсул при помощи расфасовочного аппарата: масса содержимого каждой капсулы –  $0,2 \pm 0,02$  г с содержанием активного компонента – 5 мг/капсулу; отбраковка готовых капсул. В связи с тем что технология получения капсул предполагает дальнейшую ее реализацию в производственных условиях, мы составили базовую валидационную схему, которая включает предварительный перечень критических параметров, т.к. полная валидация процесса возможна после масштабирования технологии ЛФ, как правило, на опытно-промышленных сериях ЛС (Таблица 10).

Таблица 10 – Предварительный перечень критических параметров процесса производства капсул с микрокапсулами каротиноидов

Критическая технологическая стадия	Критический параметр	Обоснование
1	2	3
Измельчение субстанции каротиноида, просев каротиноида и ВВ	размер частиц	интенсивное механическое воздействие может быть причиной изомеризации каротиноидов; посторонние частицы могут быть причиной несоответствия капсул по показателю «Описание»
Получение раствора пленкообразователя	количество компонентов и их соотношение	отклонение от нормы может быть причиной несоответствия по показателям «Количественное определение», «Описание содержимого капсул»
Микрокапсулирование	количество активного вещества и ВВ	отклонение в количественном содержании каротиноида, несоответствие по показателю «Количественное определение»
	соотношение компонентов для формирования оболочки микрокапсул	прилипание раствора полимера к стенкам реактора, нарушение формирования оболочки необходимой толщины и формы микрокапсул, несоответствие по показателю «Описание содержимого капсул»

1	2	3
Микрокапсулирование	время и скорость диспергирования каротиноида в растворе пленкообразователя	неравномерное распределение каротиноида, несоответствие по показателю «Однородность дозирования»
	время и скорость диспергирования, объем масляной фазы	нарушение процесса формирования микрокапсул, отклонения во фракционном составе микрокапсул, несоответствие по показателям «Описание содержимого капсул», «Количественное определение»
Заполнение капсул микрокапсулами	масса микрокапсулированных каротиноидов для одной капсулы	нарушение процесса дозирования каротиноидов, несоответствие капсул по показателю «Количественное определение»

Предложенные критические стадии производства капсул с микрокапсулами каротиноидов далее могут стать основой для процесса технологической валидации при последующем его выполнении на промышленных сериях ЛС.

В настоящее время качество капсул регламентировано ГФ XIII и включает следующие показатели: описание, однородность массы, подлинность, растворение, однородность дозирования, количественное определение. Определение значений указанных параметров качества капсул с  $\beta$ -каротином, капсул с ликопином, капсул с лютеином и капсул с астаксантином проводили согласно методикам ГФ XIII. Изучение стабильности микрокапсул по предложенной нами схеме хранения (Таблица 9) позволило определить упаковку капсул: широкогорлые флаконы темного стекла. С соблюдением этих условий проведено определение стабильности всех изученных капсул с микрокапсулами каротиноидов. Первичный срок годности составил 2 года.

Результат эксперимента подтвердил предположение о том, что практическим выходом этого этапа исследования являются стабильные субстанции каротиноидов, способ их стабилизации, в частности микрокапсулирование и оптимальная ЛФ – капсулы. Это согласуется с выходом блока А3 и как положительный практический фактор (вход блока А5) может быть использован при построении методологии создания ЛФ на основе каротиноидов в нотации IDEF0 (Рисунок 3).

### **Совершенствование способов анализа и технологии облепихового масла**

Высокий спрос на облепиховое масло и ЛФ с ним требует совершенствования технологии его получения. Этот процесс невозможен без проведения сравнительного анализа образцов облепихового масла, полученных по отличающимся технологиям. Проведение данной части экспериментального модуля (Рисунок 3, блок А4) обеспечивает более обоснованное моделирование обобщенной методологии в нотации IDEF0, т.к. предложенные аналитические подходы к анализу каротиноидов будут применены в исследовании и совершенствовании анализа ЛС с каротиноидами, уже зарегистрированного в РФ.

С целью выбора предпочтительной технологии и совершенствования анализа облепихового масла проведено сравнительное изучение пяти образцов этого ЛС: облепиховое масло образец №1 – облепиховое масло, полученное первичной экстракцией метилхлоридом плодов облепихи в условиях производства ЗАО «Вифитех»; облепиховое масло образец №2 – облепиховое масло, полученное экстракцией растительным маслом плодов облепихи в условиях производства ЗАО «Вифитех»; облепиховое масло образец №3 – облепиховое масло,

полученное экстракцией метиленхлоридом шрота плодов облепихи в условиях производства ЗАО «Вифитех»; облепиховое масло образец №4 – облепиховое масло промышленного производства ЗАО «Алтайвитамины» серия 15.03.13; облепиховое масло образец №5 – облепиховое масло промышленного производства ЗАО «Вифитех», серия 04.10.13. Экспериментальная часть была проведена с образцами облепихового масла «вслепую». Особенности технологии получения образцов были раскрыты производителем на этапе обсуждения результатов эксперимента.

На примере анализа образца облепихового масла №1 показано применение как наукоемких методов анализа (хромато-масс-спектрометрии), так и традиционных для фармацевтических производителей методов (спектрофотометрии в УФ- и видимой областях, ВЭЖХ, ТСХ) (Рисунок 12).

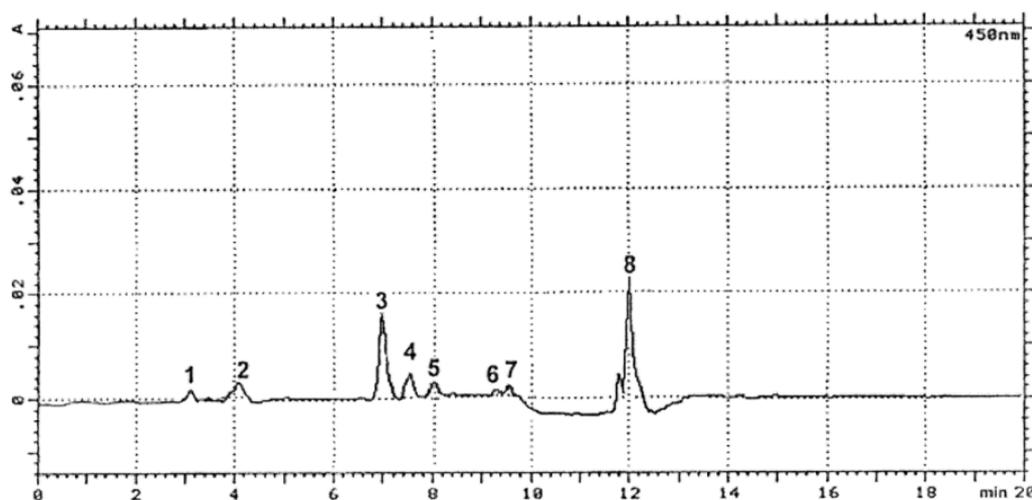


Рисунок 12 – Типовая ВЭЖХ хроматограмма образца облепихового масла

В результате сравнения со СО каротиноидов подтверждено содержание лютеина, ликопина и  $\beta$ -каротина, дополнительно было установлено присутствие пяти неидентифицированных каротиноидов (Таблица 11).

Таблица 11 – Результаты анализа образца облепихового масла\*

Время удерживания, мин	Максимумы поглощения, нм	Расчетное значение (Ш/П), %	Процентное содержание, %	Соединение и его номер пика на хроматограмме
3,15	415, 440, 469	88,8	1,5	неидентифицированное – 1
4,02	414, 438, 467	88,9	2,4	неидентифицированное – 2
6,89	421, 445, 474	60,4	33,1	лютеин – 3
7,49	452, 479	22,2	12,4	неидентифицированное – 4
8,01	424, 448, 474	68,7	5,3	ликопин – 5
9,35	448, 472	16,8	0,9	неидентифицированное – 6
9,63	459, 486	41,5	1,3	неидентифицированное – 7
12,02	425, 450, 477	25,2	43,1	$\beta$ -каротин – 8

\* – данные статистически обработаны по результатам определения в шести повторностях ( $p=0,95$ )

Методом хромато-масс-спектрометрии они были идентифицированы как неоксантин (3,15 мин), виолаксантин (4,02 мин), зеаксантин (7,49 мин),  $\beta$ -криптоскантин (9,35 мин),  $\gamma$ -каротин (9,63 мин). Количественное соотношение каротиноидов имеет следующий вид: 43,1 %  $\beta$ -каротина, 33,1 % лютеина, 12,4 % зеаксантина, 2,4 % виолаксантина и 1,5 % неоксантина.

Далее все образцы облепихового масла в петролейном эфире и н-гексане были исследованы с помощью метода спектрофотометрии в УФ- и видимой областях. Облепиховое масло идентифицировали по положению максимумов поглощения (425, 450, 477 нм в н-гексане и петролейном эфире) и в сравнении с СО  $\beta$ -каротина. Количественное содержание каротиноидов определяли с применением СО  $\beta$ -каротина и по величине удельного показателя светопоглощения – 2592 (н-гексан), 2400 (петролейный эфир). Установлено, что спектры поглощения растворов образцов облепихового масла № 1, № 4, № 5 в обоих растворителях имеют каротиноидный профиль. Для образца № 2 был применен дифференциальный вариант спектрофотометрического анализа, в результате чего были зафиксированы максимумы полос поглощения, присущие каротиноидам. Анализ образца облепихового масла № 3, полученного экстракцией шрота, показал, что кривая его спектра поглощения характеризуется неизбирательным поглощением на уровне оптической плотности около 0,2. Вероятней всего, образец №3 либо не содержит каротиноиды, либо они присутствуют в следовых количествах, либо представляет собой суммарный экстракт, содержащий вещества различной структуры, что сказывается на спектре поглощения.

Анализ образцов облепихового масла методом ТСХ проводили в условиях идентичных экспериментальным условиям анализа субстанций каротиноидов. При просмотре хроматограмм в видимом свете установлено, что на треках всех анализируемых образцов облепихового масла присутствуют зоны адсорбции на уровне зон адсорбции растворов СО  $\beta$ -каротина, ликопина и лютеина, относительный фактор удерживания  $\beta$ -каротина, ликопина, лютеина для всех образцов находился около 1,0. Важно отметить, что для растворов образцов масла в н-гексане и петролейном эфире получены сходимые результаты, т.е. природа растворителя не оказывает значимого влияния на результаты эксперимента.

В образце №1 идентифицированы  $\beta$ -каротин (ПФ I – IV), зеаксантин (ПФ I – IV), лютеин (ПФ I–IV),  $\beta$ -криптоксантин (ПФ I, III, IV), виолаксантин (ПФ I, II), ликопин (ПФ I, II, IV), неоксантин (ПФ III, IV),  $\gamma$ -каротин (ПФ IV). Для образца №2 установлено присутствие  $\beta$ -каротина (ПФ I – IV), лютеина (ПФ I – IV), зеаксантина (ПФ I, IV),  $\beta$ -криптоксантина (ПФ I, III, IV), ликопина (ПФ I, III), виолаксантина (ПФ III, IV)  $\gamma$ -каротина (ПФ II). Для образца №3 –  $\beta$ -каротин (ПФ I – IV). Образец №4 содержал  $\beta$ -каротин (ПФ I – IV), ликопин (ПФ I, II, IV), лютеин (ПФ I, II), зеаксантин (ПФ II, IV), виолаксантин (ПФ III, IV),  $\gamma$ -каротин (ПФ I, IV). В образце №5 подтверждено наличие  $\beta$ -каротина (ПФ I – IV), ликопина (ПФ IV), зеаксантина (ПФ IV),  $\gamma$ -каротина (ПФ II, IV), неоксантина (ПФ IV).

Таким образом, проанализировав образцы облепихового масла, полученные по отличающимся технологиям, можно констатировать, что наиболее богатый состав каротиноидов имеет опытный образец №1, полученный по экспериментальной технологии. С учетом того, что БАВ облепихового масла являются каротиноиды, эта технология имеет преимущества перед используемыми с позиций численного набора каротиноидов. Специфичность ТСХ-анализа повышается при условии использования СО каротиноидов. Во всех образцах с использованием всех четырех подвижных фаз был идентифицирован доминантный каротиноид облепихового масла –  $\beta$ -каротин. На основании полученных данных производителю рекомендовано внести изменения в нормативный документ (НД), регламентирующий качество облепихового масла, в частности, дополнить раздел «Подлинность» испытанием методом ТСХ.

Полученный экспериментальный материал, в частности данные по хроматографическим условиям качественного анализа каротиноидов в облепиховом масле, позволяет сделать вывод

о том, что все использованные в эксперименте ПФ при адаптации методик могут быть применены для химического скрининга ЛС природного происхождения и для идентификации в них каротиноидов.

Сравнительный анализ количественного содержания суммы каротиноидов в образцах облепихового масла показал, что и для растворов в н-гексане, и для растворов в петролейном эфире получены сопоставимые результаты (Таблица 12).

Таблица 12 – Количественное содержание суммы каротиноидов в образцах облепихового масла\*

Способ расчета количественного содержания суммы каротиноидов	Образец облепихового масла				
	№1	№2	№3	№4	№5
Метод УФ спектрофотометрии, растворитель – н-гексан					
Расчет по удельному показателю поглощения $\beta$ -каротина – 2592	0,287	0,139	—	0,193	0,192
Расчет с применением СО $\beta$ -каротина	0,270	0,130	—	0,181	0,180
Расчет по удельному показателю поглощения $\beta$ -каротина – 2400	0,363	0,146	—	0,249	0,195
Метод УФ спектрофотометрии, растворитель – петролейный эфир					
Расчет по удельному показателю поглощения $\beta$ -каротина – 2592	0,334	0,135	—	0,230	0,181
Расчет с применением СО $\beta$ -каротина	0,230	0,121	—	0,204	0,189
Метод ВЭЖХ (суммарное содержание каротиноидов)					
	0,258	0,116	—	0,189	0,185

\* – данные статистически обработаны по результатам определения в шести повторностях ( $p=0,95$ )

На основании полученных результатов можно констатировать, что максимальное содержание суммы каротиноидов характерно для экспериментального образца облепихового масла № 1. Содержание каротиноидов в промышленных образцах облепихового масла ЗАО «Алтайвитамины» (образц № 4) и ЗАО «Вифитех» (образц № 5) соответствует требованиям НД этих предприятий – не менее 0,180 %. При использовании в качестве растворителей и н-гексана, и петролейного эфира для образца №3 достоверно установить содержание каротиноидов не удалось. Наблюдается корреляция результатов анализа всех образцов облепихового масла в растворах петролейного эфира и н-гексана. Необходимо отметить, что для спектрофотометрических методик характерны завышенные результаты. Этот факт можно объяснить тем, что как для н-гексана, так и для петролейного эфира используется удельный показатель для субстанции  $\beta$ -каротина, а его величина значительно выше значений удельных показателей для других каротиноидов, которые также содержатся в облепиховом масле. Проведенные исследования, их статистическая обработка позволяют сделать вывод о том, что методики качественного и количественного определения суммы каротиноидов с применением СО  $\beta$ -каротина как доминантного каротиноида облепихового масла после апробации в условиях конкретных производств могут быть использованы в качестве фармакопейных.

Данные, полученные после проведения сравнительного анализа образцов облепихового масла, являются определяющими при построении обобщенной методологии конструирования ПФ на основе каротиноидов, т.к. связывают исследовательский эксперимент с производством и являются выходом блока А4 и входом блока А5 (Рисунок 3) дизайна исследования в нотации IDEFO.

### Совмещенная методология изучения каротиноидов и создания лекарственных средств на их основе в нотации IDEF0

Для полноценной характеристики структуры работ, направленных на изучение каротиноидов как объектов фармацевтической деятельности, а также логической организации этого процесса необходимо создание стройной системы. Крайне важно, чтобы эту систему могли использовать другие исследователи на разных этапах своей деятельности. Исследование субстанций каротиноидов и разработка ЛС на их основе является классической функциональной, производственно ориентированной системой. Проведенный IDEF0-дизайн практической части работы (Рисунок 3) и согласованность полученных экспериментальных данных подтверждают, что нотация IDEF0 может успешно использоваться для функционального моделирования исследовательской деятельности в области фармации. Основным преимуществом нотации IDEF0 является использование графического языка диаграмм, построенных и логически связанных в соответствии с правилами IDEF0, которые ратифицированы в РФ. Применение технологии IDEF0, для создания методологии исследования и работы с БАВ природного или синтетического происхождения с целью создания ЛС проведено впервые.

Цель построения модели – логическое структурирование методов, средств, приемов и подходов к процессу изучения каротиноидов и созданию ЛС на их основе. Реализация этой цели позволит любому исследователю, используя предложенную нами модель, максимально эффективно проводить дизайн своей научной работы в области изучения каротиноидов и прогнозировать результаты этой деятельности.

Изучение любого класса БАВ в итоге предполагает разработку и создание на их основе ЛС. В качестве блока контекстной диаграммы нами был выбран многоуровневый процесс – «Конструирование ЛС на основе каротиноидов» (Рисунок 13).

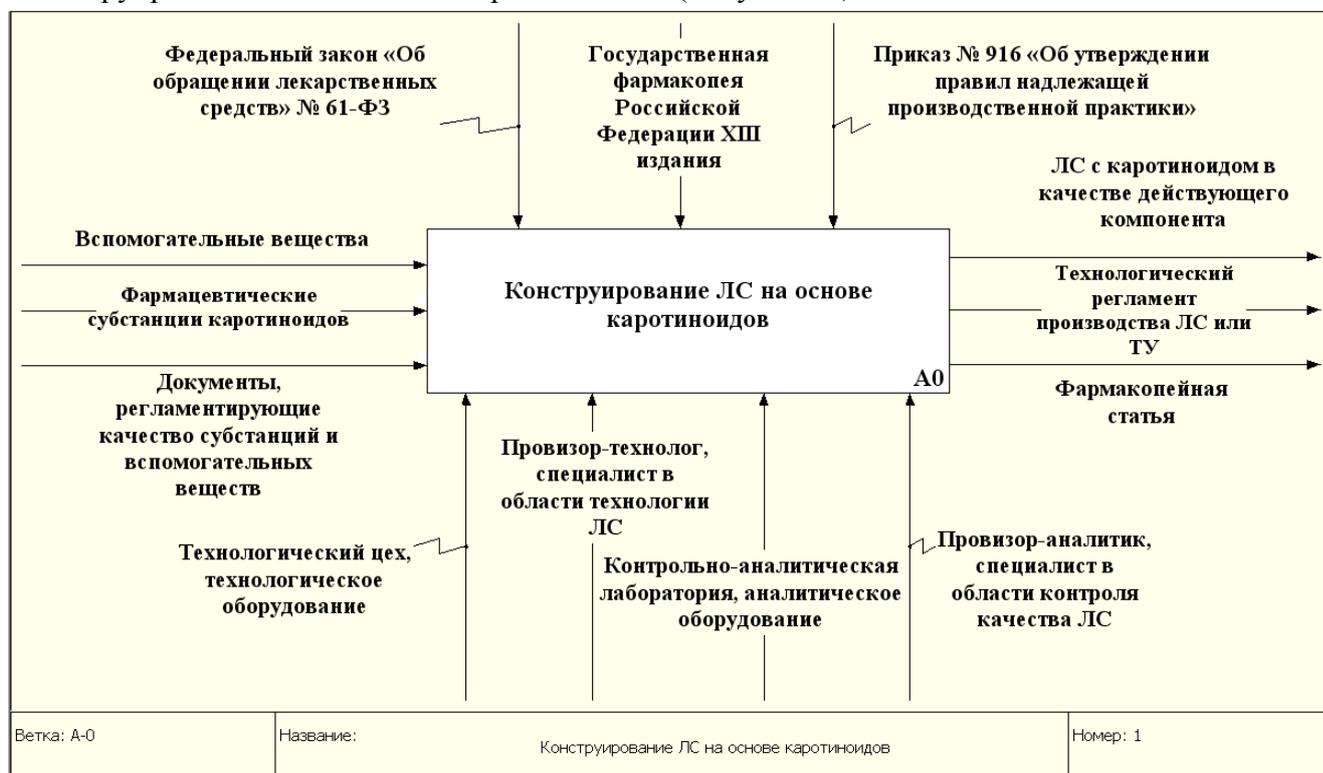


Рисунок 13 – Контекстная диаграмма процесса изучения каротиноидов и создания ЛС на их основе

Контекстная диаграмма, которая всегда имеет номер «A0», отражает генеральное направление (процесс или идею), которому подчинено все исследование. Такая формулировка контекстной диаграммы представляется нам оправданной, т.к. объединяет весь спектр исследований, необходимых для реализации поставленной цели. Одним из условий успешного построения диаграмм IDEF0 является детализация любой из дочерних диаграмм, причем уровень детализации исследователь может выбирать самостоятельно.

Как и любой научно-исследовательский процесс, изучение каротиноидов регулируется в рамках правового поля. Это отражается в соблюдении исследователем требований нормативно правовых документов, поэтому они выделены нами в качестве управлений на контекстной диаграмме и диаграмме детализации первого уровня (Рисунок 13). Реализацию поставленной цели, отраженной в контекстной диаграмме, осуществляют исследователи, в частности специалисты в области фармацевтической технологии и анализа ЛС, которые используют весь набор материально-технических средств, обеспечивающий проведение квалифицированного эксперимента: цех, научную лабораторию, оборудование, приборы, материалы, реактивы и др. Это отражено нами в виде механизмов контекстной диаграммы (Рисунок 13). Входом для диаграммы первого уровня являются те материалы, которые исследователь получает на подготовительном, как правило, теоретическом этапе исследования. В частности, это могут быть результаты информационно-патентного поиска, предварительные собственные исследования, данные об исходном сырье и растворителях и т.п. (Рисунок 13). На контекстной диаграмме рисунка 13 показано, что выходами являются «ЛС с каротиноидом в качестве действующего компонента» и НД, регулирующие его производство и качество. Фактически выходы – это практическая значимость всего проведенного исследования и его этапов.

В соответствии с принципами построения IDEF0 модели нами произведена детализация контекстной диаграммы. Дочерняя диаграмма первого уровня состоит из пяти смысловых блоков-подфункций (Рисунок 14).

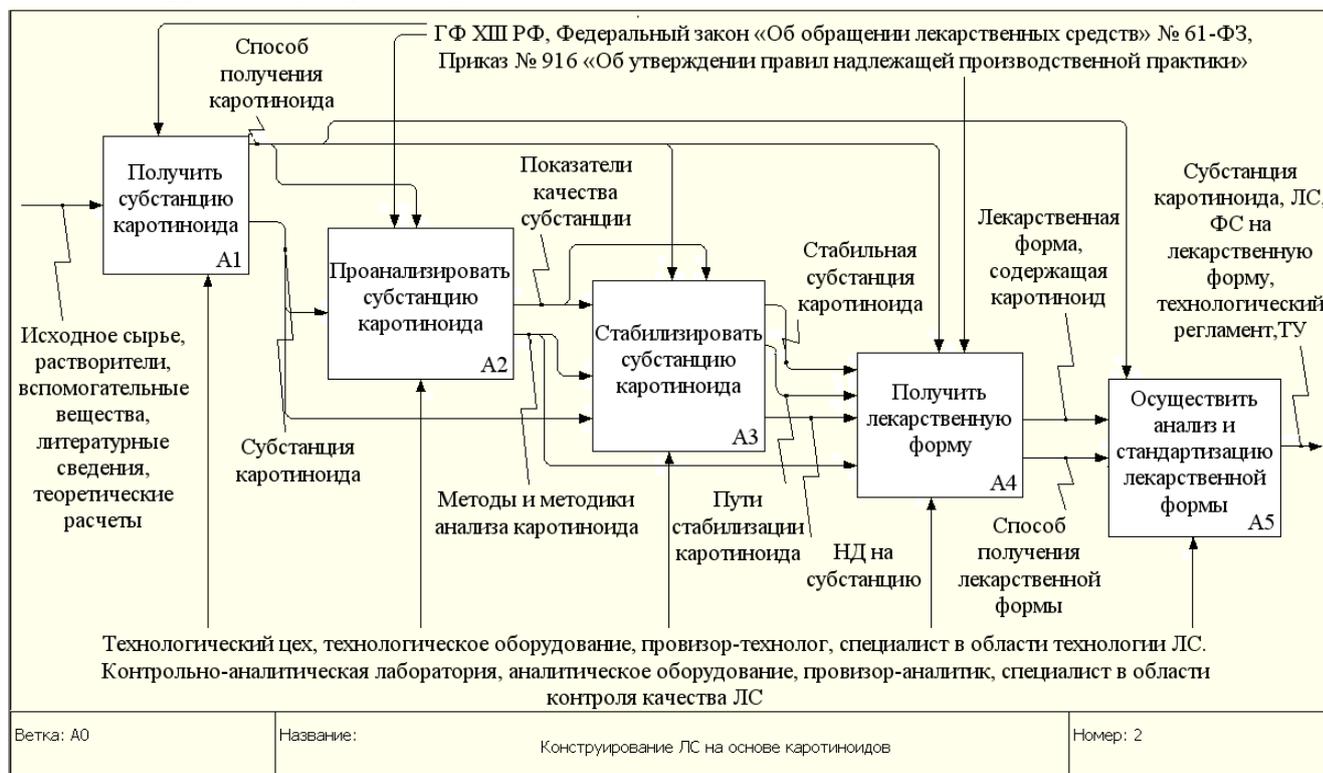


Рисунок 14 – Диаграмма первого уровня детализации

Представленные пять блоков-подфункций объединяют весь комплекс взаимосвязанных теоретических и экспериментальных исследований, которые необходимо провести для решения задачи по созданию ЛС, содержащего в качестве активного компонента индивидуальный каротиноид: получить субстанцию каротиноида (A1); проанализировать субстанцию каротиноида (A2); стабилизировать субстанцию каротиноида (A3); получить ЛФ (A4); осуществить анализ и стандартизацию полученной ЛФ (A5).

Как демонстрируется на диаграмме 14, входы, управления, выходы и механизмы блоков-подфункций взаимосвязаны. Например, выходы блока A1 – «Субстанция каротиноида» и «Способ получения каротиноида» являются управлением и входом для блоков-подфункций A2, A3, A4 и A5; выходы блока A2 – «Методы и методики анализа каротиноидов», «Показатели качества» – входы для блоков A3, A4 и управление для блока A3; выходы A3 – «Пути стабилизации каротиноида» и «Стабильная субстанция каротиноида» – входы для A4. Выходы A4 выступают в качестве входов для блока A5. Эта взаимосвязь подфункций позволяет гармонизировать этапы исследования и делает их логически связанными.

Очевидно, что каждый из подуровней от A1 до A5, представленных на рисунке 14, требует дальнейшего уточнения. Диаграмма 14 содержит только обобщенные этапы исследования, что согласуется с требованиями к составлению моделей в нотации IDEF0: чем выше уровень детализации, тем более обобщенные задачи он содержит, и чем ниже уровень диаграммы, тем конкретней должны быть определения функциональных блоков.

Теоретическая и экспериментальная база всех уровней детализации подфункции A1 общей модели – это результаты технологического эксперимента в рамках блока A1 (Рисунок 3) дизайна эксперимента. Второй уровень детализации изучаемого процесса представлен на рисунке 15. Как того требует стандарт IDEF0, диаграмме всегда присваивается номер того узла, который она конкретизирует. Диаграмма 15 является дочерней для блока A1 диаграммы 14 и содержит 5 блоков, которые имеют номера от A11 до A15.



Рисунок 15 – Дочерняя диаграмма блока A1 «Получить субстанцию каротиноида»

Структура диаграммы 15, в частности входы, показывает ее взаимосвязь с диаграммами более высокого уровня (Рисунки 13, 14). Помимо этого, выход блока A15 «Способ получения каротиноида» диаграммы 15 регулирует работу подфункций A2, A3, A4 и A5 диаграммы 14. Выход «Субстанция каротиноида» является входами для блоков A2, A3 на диаграмме 14, что подтверждает вертикальную логическую связь диаграмм 13, 14, 15.

При получении индивидуальных каротиноидов особое значение имеет подтверждение индивидуальности полученного соединения, поэтому была проведена детализация подфункции A2 «Проанализировать субстанцию каротиноида» диаграммы первого уровня (Рисунок 16). Экспериментальной и теоретической основой для этого этапа моделирования стали результаты аналитического исследования в рамках блока A2 «Провести современное аналитическое исследование полученных субстанций» (Рисунок 3).



Рисунок 16 – Детализация второго уровня блока A2 «Проанализировать субстанцию каротиноида»

Процесс анализа каротиноидов объединяет несколько направлений. Первое состоит в подтверждении получения конкретного(ых) каротиноида(ов), которое базируется на доказательстве его (их) структуры с помощью передовых аналитических методов. Второе заключается в установлении степени чистоты полученного(ых) каротиноида(ов) с применением хроматографических и спектральных методов. Третье неразрывно связано с двумя первыми и предполагает определение количественного содержания каротиноидов в полученном(ых) образце(ах) (Рисунок 16). Каждое из этих направлений может быть реализовано как самостоятельное исследование в рамках общего научного направления. Логическая связь диаграмм нижнего и верхнего уровней прослеживается во взаимном влиянии входов, управлений и выходов. Например, общими управлениями диаграммы 14 первого уровня детализации и диаграммы 16 второго уровня детализации является способ получения каротиноида. Вход детализации блока A2 «Субстанция каротиноида предполагаемого строения» является выходом блока A1 контекстной диаграммы, т.е. диаграмма 16 логически вписывается в общую структуру контекста (Рисунок 14). Выходы диаграммы детализации A2 –

«Показатели качества субстанции», «Методики и методы анализа субстанции» связывают ее со следующим блоком-подфункцией – А3 «Стабилизировать субстанцию каротиноида». При условии анализа и учета взаимного влияния управлений диаграммы 16 исследователь, который работает в области анализа каротиноидов, может провести построение собственного эксперимента по анализу любого каротиноида. Кроме того, он может использовать один или несколько доступных для него аналитических методов, получая при этом достоверный результат, например, совмещенный анализ данных, полученных методами ЯМР и ИК-спектроскопии или ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии. Безусловно, что использование всего спектра методов, подтверждающих структуру полученного каротиноида, является оптимальным. Детализация второго уровня блока А2 «Проанализировать субстанцию каротиноида» является связующим звеном между подфункциями А2 и А3 контекстной диаграммы 13.

В связи с тем что получение стабильной субстанции каротиноидов является многогранной технологической задачей, было проведено структурирование этого блока (Рисунок 17). Экспериментальной базой для детализации второго уровня подфункции А3 «Стабилизировать субстанцию каротиноида» были материалы раздела «Разработка технологии стабилизации субстанций каротиноидов и получение лекарственной формы на их основе».

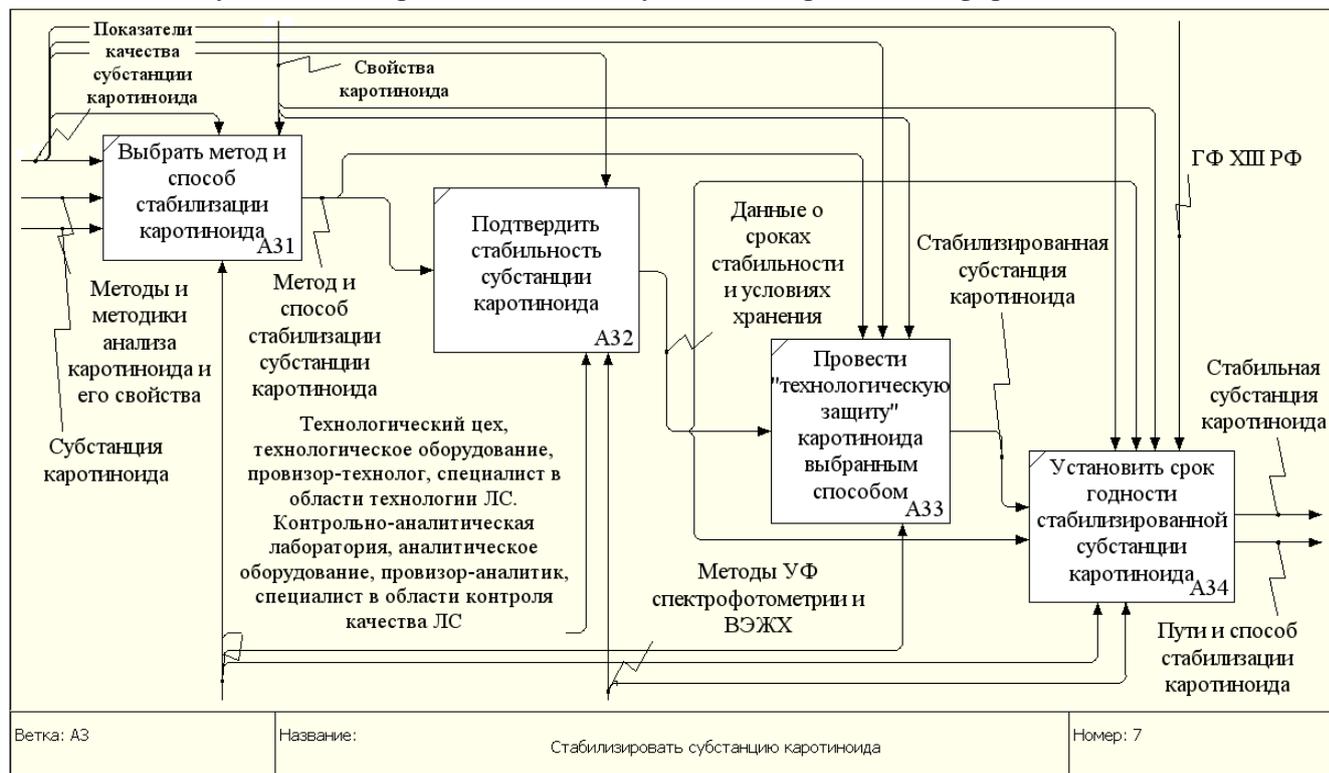


Рисунок 17 – Детализация второго уровня блока А3 «Стабилизировать субстанцию каротиноида»

Взаимосвязь подфункции А3 «Стабилизировать субстанцию каротиноида» с другими блоками контекстной диаграммы 14 прослеживается в общности их входов и выходов и реализуется детализацией второго уровня (Рисунок 17). Например, выходы блока А2 – «Показатели качества субстанции» и «Методы и методики анализа каротиноидов» являются входами для детализированной диаграммы 17, в частности блока А31 и подфункции А3. Управлением для всех блоков диаграммы 17 является интерфейс «Показатели качества субстанции». Аналогично регулируется работа этого уровня модели данными о «Свойствах каротиноидов». Первый блок диаграммы 17 – А31 «Выбрать метод стабилизации каротиноида»

может быть реализован с помощью любого технологического приема, однако он должен обязательно учитывать «Свойства изучаемого каротиноида», в частности, его термолабильность и светочувствительность, поэтому этот принцип отражен в интерфейсе. Если направление, выбранное исследователем, окажется верным, тогда результатом его работы станет «Стабильная субстанция каротиноида» и «Способ стабилизации каротиноида», что закреплено в названиях интерфейсных выходов диаграммы 17.

Наличие стабилизированной субстанции дает возможность получения ЛФ на ее основе, что придает исследованию заверченный вид. Только гармоничное и взаимосвязанное решение технологических и аналитических задач позволяет эффективно конструировать ЛФ.

Технологический аспект этого направления отражен на диаграмме 18, аналитическое сопровождение зафиксировано в диаграмме 19.

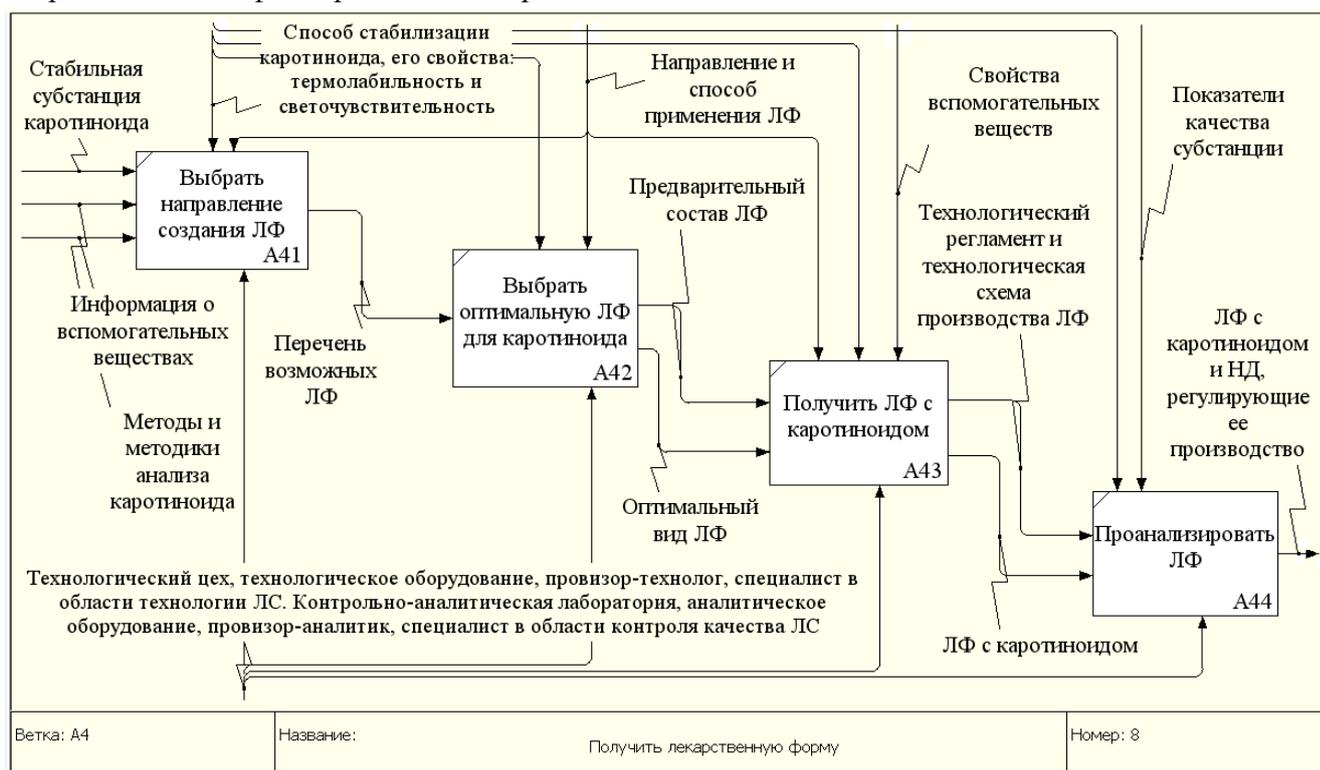


Рисунок 18 – Детализация второго уровня блока А4 «Получить лекарственную форму»

С общепрофессиональных позиций крайне сложно изолированно рассматривать процесс получения ЛФ с каротиноидом и ее анализ. Поэтому мы синхронизировали функционирование модели для блоков А4 и А5, отраженных на диаграммах 18 и 19.

Одной из первоочередных задач, которые должен решить исследователь, – это выбор направления создания ЛФ. Как показано в структуре модели, управляющим интерфейсом для этой функции является «Способ стабилизации субстанции» (Рисунок 18). Второй аспект, которым следует руководствоваться исследователю, – аналитические возможности, т.е. методы анализа будущей ЛФ, которые базируются на результатах анализа субстанции каротиноида. Данное положение отражено в блоках детализации подфункции А5 диаграммы 19: вход блока А51 «Методы и методики анализа субстанций каротиноидов» является управлением для всех этапов анализа и стандартизации ЛФ с каротиноидами – блоки А52, А53, А54 диаграммы 19.

Учитывая разнонаправленность фармакологической активности каротиноидов, исследователь при выборе ЛФ должен принимать во внимание «Направление и способ применения ЛФ» (Рисунок 18).

Например, ЛФ с  $\beta$ -каротином могут применяться и наружно и внутрь; лютеин входит, как правило, во внутренние ЛС; ликопин чаще используют в виде капсул и таблеток, хотя имеются сведения о его трансдермальной активности; для астаксантина как «короля антиоксидантов среди каротиноидов» преимущественным является прием внутрь. Очевидно, что если у исследователя имеются данные по специфическому виду активности исследуемого каротиноида, то эти данные являются управляющими интерфейсами в процессе выбора ЛФ с каротиноидом (Рисунок 18). Взаимосвязь между получением ЛФ с каротиноидом (блок А43 диаграммы 18), ее анализом (блок А44 той же диаграммы) и стандартизацией (блоки А52 – А54 диаграммы 19) прослеживается в общности интерфейсов.

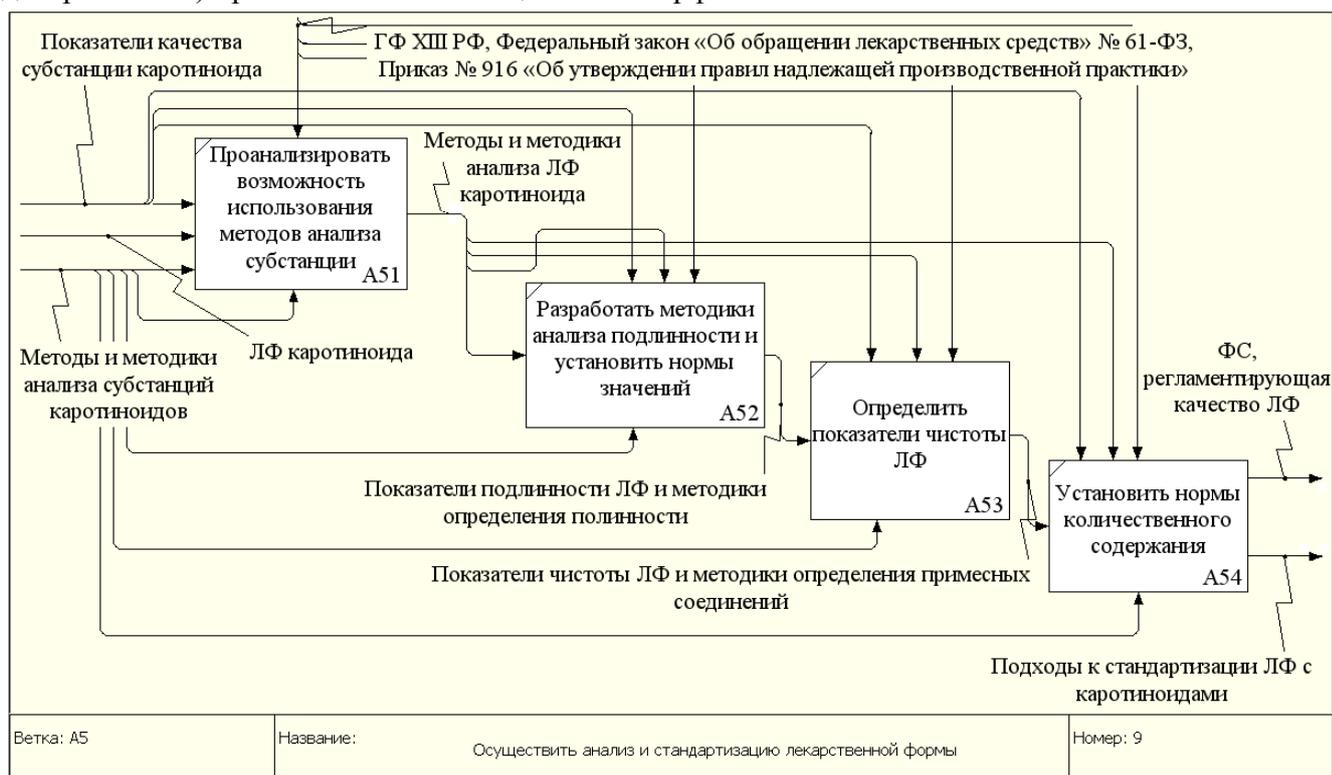


Рисунок 19 – Детализация второго уровня блока А5  
«Осуществить анализ и стандартизацию лекарственной формы»

Так, общими управляющими для обеих диаграмм 18 и 19 являются Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» № 61-ФЗ, Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание», «Показатели качества субстанции каротиноида», что подтверждает соблюдение принципа сквозной стандартизации субстанции и ЛФ на ее основе. Кроме того, логичным представляется то, что выходами для обоих уровней детализации А4 и А5 являются «ЛФ с каротиноидом и НД, регулирующее ее производство» и «ФС, регламентирующая качество ЛФ», которые представляют собой практический выход всего исследования (Рисунок 13).

Таким образом, построенная в нотации IDEF0 модель может быть матрицей для проведения всего объема исследований, связанных с изучением каротиноидов как класса БАВ, с получением субстанции каротиноида, разработкой и стандартизацией ЛФ на ее основе. Логическая взаимосвязь уровней и подуровней предложенной нами модели позволяет использовать ее полностью и проводить частичное планирование и прогнозирование более узких этапов работы, причем взаимосвязь входов, управлений, механизмов реализации функций и выходов позволят и полному, и фрагментарному исследованию быть научно-обоснованными и иметь практическую значимость.

## ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Анализ данных литературы показал, что несколько поколений исследователей создали приемлемую экспериментальную базу, которая является основой для дальнейшего перспективного развития исследований в области получения и стабилизации каротиноидов в виде моносоединений, а также ЛС на их основе.

2. Одним из итогов диссертационного исследования является сформированная теоретическая основа технологии получения индивидуальных каротиноидов, которая базируется на результатах комплексных технологических исследований получения индивидуальных каротиноидов из источников растительного и животного происхождения.

3. Построена математическая модель получения каротиноидов и установлены оптимальные значения для пяти технологических показателей, что позволит в дальнейшем провести масштабирование технологии получения индивидуальных каротиноидов.

4. С учетом физико-химических свойств каротиноидов в качестве способа их стабилизации предложено микрокапсулирование; наиболее эффективным признано получение микрокапсул диспергированием в несмешивающейся жидкости. Экспериментально определена оптимальная область технологических параметров для получения микрокапсул с модельными субстанциями каротиноидов:  $\beta$ -каротином, ликопином, лютеином, астаксантином, и предложена унифицированная технологическая схема получения микрокапсул. Предложенный алгоритм хранения субстанций каротиноидов в нативном и микрокапсулированном виде позволил изучить стабильность субстанций модельных каротиноидов. Показано, что субстанции, заключенные в микрокапсулы и хранящиеся при комнатной температуре без воздействия света, остаются стабильными в течение двух лет, для нативных каротиноидов этот показатель составил один год.

5. В качестве оптимальной ЛФ предложены капсулы, содержащие микрокапсулированные каротиноиды. Разработана технологическая схема получения капсул с субстанциями индивидуальных каротиноидов, одной из технологических операций которой является стадия микрокапсулирования. Выделены критические стадии производства капсул с микрокапсулами каротиноидов, что может стать основой последующей валидации, а затем производственного масштабирования.

6. Одним из итогов проведенного исследования является подтверждение структуры, анализа и стандартизации индивидуальных каротиноидов и ЛФ на их основе: анализ полученных субстанций четырех модельных каротиноидов спектральными методами показал, что достоверным для подтверждения их структуры является сочетание ЯМР, ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии. При проведении предварительных исследований, а также в производственных условиях идентификацию каротиноидов следует проводить методами ИК-спектроскопии и УФ-спектрофотометрии, причем повышение специфичности последнего достигается путем расчета соотношения интенсивности третьего максимума поглощения ко второму (Ш/П, %), измерением спектров поглощения в трех растворителях и применением стандартных образцов каротиноидов. Совокупность результатов анализа субстанций каротиноидов методами ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ позволила подтвердить подлинность полученных субстанций каротиноидов, определить чистоту и количественное содержание. Аналитические исследования капсул с микрокапсулированными субстанциями  $\beta$ -каротина, ликопина, лютеина, астаксантина позволили предложить основные показатели и нормы качества ЛФ: внешний вид, описание содержимого капсул, подлинность, однородность массы, распадаемость, однородность дозирования, количественное определение.

7. Связь научного исследования с практической производственной сферой реализована через результаты «слепого» сравнительного анализа экспериментальных и промышленных образцов ЛС – облепихового масла с помощью УФ-спектрофотометрии (в двух растворителях), а также ТСХ и ВЭЖХ, что позволило выбрать оптимальную обновленную технологию этого ЛС. На примере анализа образцов облепихового масла, зарегистрированного в Российской Федерации ЛС с каротиноидами, показан диапазон применения как современных наукоемких методов анализа, так и традиционных для фармацевтических производителей методов – УФ-спектрофотометрии и ТСХ.

8. Основным теоретическим итогом исследования является то, что впервые для фармацевтической отрасли предложена совмещенная методологическая IDEF0 модель изучения природных БАВ на примере каротиноидов с целью создания ЛС на их основе. Методологическая модель технологии получения индивидуальных каротиноидов, ее аналитического сопровождения, процесса конструирования ЛФ с каротиноидами, а также анализа и стандартизации ЛФ может быть использована на любом этапе изучения каротиноидов и разработки ЛФ на их основе. Построенная модель функционирует в полном объеме, а отдельные ее уровни детализации могут быть применены исследователями в качестве исходной матрицы для более узконаправленных исследований каротиноидов. Предложенная методология изучения каротиноидов с учетом взаимного влияния уровней детализации позволяет проводить прогнозирование результатов исследований в целом и фрагментарно, что обусловлено и подтверждено структурой самой модели.

#### **Перспективные направления использования результатов диссертационного исследования**

Дальнейшее промышленное масштабирование результатов по получению и анализу субстанций индивидуальных каротиноидов, их практическое внедрение позволят расширить номенклатуру отечественных ЛС с моносоединениями природного происхождения. Расширению ассортимента отечественных ЛС природного происхождения будут способствовать исследования, связанные с получением и суммарных препаратов каротиноидов.

Тандемное использование технологических (экстракционные приемы) и аналитических (приемы идентификации и установления структуры) результатов настоящего исследования имеет перспективы применения при изучении ЛРС как источников каротиноидов.

Широкие возможности для дальнейшего развития имеет направление по стабилизации субстанций каротиноидов, в частности, работы в области оптимизации микрокапсулирования каротиноидов как моделей крайне липофильных ЛС.

Интересным представляется перспектива изучения моделирования высвобождения каротиноидов из микрокапсул и капсул и создания ЛФ с модифицированным высвобождением.

Значимым для практической и экспериментальной медицины будет установление специфической фармакологической активности индивидуальных каротиноидов, а накопление достаточного объема этого экспериментального материала позволит в дальнейшем достоверно проводить прогнозирование взаимосвязи «структура-активность» для этого класса соединений.

Важной является разработка направления, связанного с целенаправленным прогнозированием структуры, специфической активности и синтезом новых полусинтетических производных индивидуальных каротиноидов.

Оптимизацию и прогнозирование результата большинства из вышеописанных перспективных направлений можно провести, используя методологическую модель в нотации IDEF0.

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Патент №2648452 Российская Федерация, МПК А61К 36/00 (2006.01), А61К 35/56 (2015.01), А61К35/612 (2015.01), В01D 11/02 (2006.01) Способ получения индивидуальных каротиноидов : №2016148100 : заявл. 07.12.2016 : опубл. 26.03.2018 / **А.Г. Курегян**, С.В. Печинский, Э.Ф. Степанова. – 3 с.
2. Патент №2659165 Российская Федерация, МПК А61К 36/185 (2006.01), В01D 11/02 (2006.01), С07С 403/00 (2006.01), С07С 403/24 (2006.01) Способ разделения каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов листьев крапивы двудомной : №20171115145 : заявл. 27.04.2017 : опубл. 28.06.2018 / **А.Г. Курегян**, С.В. Печинский, Э.Ф. Степанова. – 3 с.
3. **Курегян, А.Г.** Результаты контент-анализа номенклатуры биологически активных добавок к пище, содержащих каротиноиды / А.Г. Курегян, С.В. Печинский // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – №8. – С. 134 – 138.
4. Печинский, С.В. Структура и биологические функции каротиноидов (обзор) / С.В. Печинский, **А.Г. Курегян** // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2013. – №9. – С. 4 – 15.
5. Печинский, С.В. Влияние каротиноидов на иммунитет (обзор) / С.В. Печинский, **А.Г. Курегян** // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2013. – №10. – С. 3 – 8.
6. Печинский, С.В. Контент-анализ номенклатуры субстанций и лекарственных препаратов, содержащих каротиноиды / С.В. Печинский, **А.Г. Курегян**, И.Н. Зилфикаров // *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. – 2013. – №11 (154), Вып. 22/2. – С. 26 – 31.
7. Ким, В.Э. Биофармацевтические исследования комплексного микрокапсулированного извлечения, содержащего фитокомпозицию седативного действия / В.Э. Ким, **А.Г. Курегян**, Э.Ф. Степанова // *Современные проблемы науки и образования*. – 2014. – № 6. – URL: [www.science-education.ru/120-15933](http://www.science-education.ru/120-15933).
8. **Курегян, А.Г.** Спектрофотометрия в анализе каротиноидов / А.Г. Курегян // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – №2, Ч. 23. – С. 5166 – 5172.
9. **Курегян, А.Г.** Хроматографические методы, используемые в анализе каротиноидов (обзор) / А.Г. Курегян, С.В. Печинский, И.Н. Зилфикаров // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2015. – № 11. – С. 3 – 16.
10. **Курегян, А.Г.** Изучение каротиноидов тыквы методами спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии / А.Г. Курегян // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 1. – URL: [www.science-education.ru/125-19732](http://www.science-education.ru/125-19732).
11. **Курегян, А.Г.** Анализ БАД, содержащих астаксантин и лютеин, методом тонкослойной хроматографии / А.Г. Курегян // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 2. – URL: <http://www.science-education.ru/129-21655>.
12. **Курегян, А.Г.** Качественный и количественный анализ капсул «Биоастин» / А.Г. Курегян // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 2. – URL: [www.science-education.ru/129-21685](http://www.science-education.ru/129-21685).
13. **Курегян, А.Г.** Сравнительный анализ каротиноидов облепихового масла методом тонкослойной хроматографии / А.Г. Курегян, С.В. Печинский, Е.А. Карандеева // *Современные*

проблемы науки и образования. – 2015. – № 2. – URL: <http://www.science-education.ru/129-23071>.

14. **Курегян, А.Г.** Получение каротиноидов и их идентификация методами спектроскопии в ИК- и УФ- областях / А.Г. Курегян, С.В. Печинский // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – № 1. – С. 22 – 27.

15. **Курегян, А.Г.** Оптимизация технологии получения  $\beta$ -каротина методом математического планирования эксперимента / А.Г. Курегян, Э.Ф. Степанова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 1(18). – С. 66 – 69.

16. **Курегян, А.Г.** Методология изучения каротиноидов и создания лекарственных средств на их основе в нотации IDEF0 / А.Г. Курегян, Э.Ф. Степанова, С.В. Печинский, Э.Т. Оганесян // Астраханский медицинский журнал. – 2018. – №2(13). – С. 80 – 89.

17. Степанова, Э.Ф. Разработка и анализ жидкого экстракта цветков липы / Э.Ф. Степанова, Д.В. Веселова, А.Г. Курегян, М.А. Огай, А.М. Темирбулатова, Т.С. Кочконян // Фармация. – 2019. – №2 (68). – С. 33 – 38.

18. Печинский, С.В. Синтез сложных эфиров лютеина, астаксантина и прогноз их активности / С.В. Печинский, А.Г. Курегян, Э.Т. Оганесян, Э.Ф. Степанова // Журнал общей химии. – 2019. – №5 (89). – С. 721 – 725.

19. Печинский, С.В. Разработка и анализ микрокапсул с ликопином / С.В. Печинский, Т.Ф. Маринина, А.Г. Курегян, О.В. Авдеева // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов – Пятигорск.: Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ МЗ РФ, 2013. – Вып. 68. – С. 192 – 193.

20. **Курегян, А.Г.** Анализ номенклатуры субстанций каротиноидов и БАД на их основе / А.Г. Курегян, С.В. Печинский // Экономика, социология, право в современном мире: проблемы и поиск решений: материалы 17-й Международной научно-практической конференции 7 – 8 июня 2013 г. – Пятигорск, 2013. – С. 314 – 318.

21. **Курегян, А.Г.** Способ получения каротиноидов из растительного сырья / А.Г. Курегян, С.В. Печинский // Современная медицина актуальные вопросы: материалы XXI международной заочной научно-практической конференции 29 июля 2013 г. – Новосибирск.: Издательство СибАК, 2013. – С. 94 – 99.

22. **Курегян, А.Г.** Способы получения каротиноидов, лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище на их основе (обзор) / А.Г. Курегян, С.В. Печинский, И.Н. Зилфикаров // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – Т. 1, №6. – С. 54 – 63.

23. **Курегян, А.Г.** Контент-анализ номенклатуры биологически активных добавок к пище, содержащих индивидуальные каротиноиды / А.Г. Курегян, С.В. Печинский, С.В. Мирзоян // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сборник научных трудов – Пятигорск.: Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ МЗ РФ, 2015. – Вып.70 . – С. 362 – 366.

24. **Курегян, А.Г.** Выбор экстрагента и изучение каротиноидного состава *Cucurbita maxima Duch.* / А.Г. Курегян, С.В. Печинский, С.Л. Аталикова // Современные концепции научных исследований: материалы XII международной научно-практической конференции 27 – 28 марта 2015 г. – Москва.: Евразийский союз ученых (ЕСУ). – 2015. – № 3(12). – С. 155 – 157.

25. **Курегян, А.Г.** Выделение астаксантина из панцирей креветок / А.Г. Курегян, С.В. Печинский, М.В. Горошко // Современные концепции научных исследований: материалы

- XVI международной научно- практической конференции 24 – 25 июля 2015 г. – Москва.: Евразийский союз ученых (ЕСУ). – 2015. – № 7 (16). – С. 98 – 100.
26. **Курегян, А.Г.** Количественное определение лютеина в капсулах «Лютеин 100%» / А.Г. Курегян // Молодые ученые и фармация XXI века: сборник научных трудов. – Москва.: ВИЛАР, 2015. – С. 295 – 298.
27. **Курегян, А.Г.** Возможности совершенствования технологии получения каротиноидов на этапе экстракции / А.Г. Курегян, Э.Ф. Степанова, С.В. Печинский // Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине: сборник научных трудов международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию ВИЛАР. – Москва.: Щербинская типография. – 2016. – С. 497 –501.
28. **Курегян, А.Г.** Перспективность создания лекарственных средств, содержащих индивидуальные каротиноиды / А.Г. Курегян // Вопросы современной науки: проблемы, тенденции и перспективы: сборник публикаций научного журнала «Chronos» по материалам IV международной научно-практической конференции. – Москва.: Научный журнал «Chronos», 2016. – С. 114 – 118.
29. **Курегян, А.Г.** Методика количественного определения ликопина и ее аттестация / А.Г. Курегян // NOVATION. – 4 июля 2016 г. – Болгария, 2016. – №4, Ч. 2. – С. 61 –64.
30. Степанова, Э.Ф. Выделение биологически активных веществ из растительных объектов в военно-полевой технологии лекарственных средств на примере крапивы двудомной (*Urtica dioica L.*) / Э.Ф. Степанова, **А.Г. Курегян**, С.В. Печинский, Ю.Ю. Жидкова // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2017. – №3(59). – С. 134 – 139.
31. Галкина, Д.И. Экстракция и анализ каротиноидной фракции листьев крапивы двудомной (*Urtica dioica l.*) / Д.И. Галкина, **А.Г. Курегян** // Беликовские чтения: сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции. – Пятигорск.: Рекламно-информационное агентство на Кавминводах, 2017. – С. 28-30.
32. **Курегян, А.Г.** Совмещенная технология получения микрокапсул с каротиноидами и спансул на их основе // А.Г. Курегян, С.В. Печинский // Медицина и фармакология: научные приоритеты ученых: сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. – Пермь, 2017. – № 2. – С. 61 – 64.
33. **Kuregyan, A.G.** A comparative study of the stability of individual carotenoids / A.G. Kuregyan, S.V. Pechinsky // Scientific research of the SCO countries: synergy and integration (Reports in English. Part 3): Materials of the International Conference. – Beijing, China, 2019. – P. 129 – 137.
34. **Курегян, А.Г.** Хроматографические методы в анализе лекарственных средств / А.Г. Курегян, С.В. Печинский // Учебное пособие, рекомендованно УМО по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебного пособия для студентов фармацевтических вузов и фармацевтических факультетов, обучающихся по специальности «фармация» (Письмо №40/05.05-20 от 30.12.20104). – Волгоград.: Издательство ВолгГМУ, 2017. – 80 с.
35. **Курегян, А.Г.** Спектроскопия в инфракрасной области и ее использование в фармацевтическом анализе / А.Г. Курегян, С.В. Печинский // Учебное пособие, рекомендованно УМО по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебного пособия для студентов фармацевтических вузов и фармацевтических факультетов, обучающихся по специальности «фармация» (Письмо №355/05.05-20 от 08.10.20104). – Пятигорск.: Рекламно-информационное агентство на Кавминводах, 2019. – 92 с.

**Курегян Анна Гургеновна (Россия)**

**«Теоретическое и экспериментальное обоснование получения индивидуальных каротиноидов и создание на их основе лекарственных средств»**

Теоретически и экспериментально обоснована технологическая концепция получения индивидуальных каротиноидов природного происхождения, новизна которой подтверждена патентами Российской Федерации «Способ получения индивидуальных каротиноидов» (патент РФ №2648452) и «Способ разделения каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов листьев крапивы двудомной» (патент РФ № 2659165). Впервые осуществлено построение математической модели получения индивидуальных каротиноидов (на примере  $\beta$ -каротина, ликопина, лютеина, астаксантина), позволяющей проводить масштабирование и адаптацию технологии к производственным условиям.

Теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены условия и принципы стабилизации субстанций каротиноидов и технологии получения их ЛФ.

Обобщены и систематизированы подходы к анализу каротиноидов и ЛС на их основе, что является методологической основой аналитического сопровождения технологии получения субстанций каротиноидов и служит отправной точкой их стандартизации.

Адекватность предложенных аналитических приемов подтверждена в процессе анализа уже зарегистрированного в Российской Федерации препарата, содержащего каротиноиды.

Впервые для фармацевтической отрасли сконструирована и представлена методологическая концепция получения природных субстанций каротиноидов, технологии их ЛФ и аналитического сопровождения этих процессов в нотации IDEF0. Предложенная методология в нотации IDEF0 позволяет формировать дизайн любого исследования этой группы БАВ.

**Kuregyan Anna Gurgenovna (Russia)**

**«Theoretical and experimental justification for obtaining individual carotenoids and the creation of drugs on their basis»**

The technological concept of obtaining individual carotenoids of natural origin is theoretically and experimentally substantiated, the novelty of which is confirmed by the patents of the Russian Federation «Method for the production of individual carotenoids» (patent RF № 2648452) and «Method for the separation of carotenes, xanthophylls and chlorophylls of dioica nettle leaves» (patent RF № 2659165). For the first time, a mathematical model was constructed for the production of individual carotenoids (for example,  $\beta$ -carotene, lycopene, lutein, astaxanthin), which allows scaling and adaptation of the technology to production conditions.

Theoretically substantiated and experimentally confirmed the conditions and principles of stabilization of substances of carotenoids and technologies for their LF production.

The approaches to the analysis of carotenoids and drugs based on them are generalized and systematized, which is the methodological basis for the analytical support of the technology for obtaining carotenoid substances and serves as the starting point for their standardization.

The adequacy of the proposed analytical techniques was confirmed in the process of analysis of a drug containing carotenoids already registered in the Russian Federation.

For the first time for the pharmaceutical industry, a methodological concept was developed and presented for the production of natural substances of carotenoids, the technology of their LF and the analytical support of these processes in the IDEF0 notation. The proposed methodology in the IDEF0 notation allows you to shape the design of any study of this group of biologically active substances.

**Курегян Анна Гургеновна**

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ  
ОБОСНОВАНИЕ ПОЛУЧЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ  
КАРОТИНОИДОВ И СОЗДАНИЕ НА ИХ ОСНОВЕ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

14.04.01 – технология получения лекарств

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора фармацевтических наук