

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора фармацевтических наук

Научные консультанты:

доктор фармацевтических наук Степанова Э.Ф.

доктор фармацевтических наук Оганесян Э.Т.

Пятигорск, 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КАРОТИНОИДОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	17
1.1 Социально-медицинская значимость каротиноидов	17
1.2 О структурных особенностях каротиноидов	21
1.3 Нормы потребления основных каротиноидов и их содержание в различных природных источниках	25
1.4 Технологические подходы к получению каротиноидов	28
1.5 Состояние и перспективы анализа каротиноидов	32
1.6 Микрокапсулирование в процессе создания лекарственных средств	40
1.7 Функциональное моделирование производственно ориентированных систем	44
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ	48
ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ	50
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	51
2.1 Объекты, оборудование, реактивы и материалы	51
2.2 Методы исследования	55
2.3 Методики исследования и условия проведения испытаний	59
2.4 Дизайн и теоретическая модель исследования в нотации IDEF0	69
ГЛАВА 3 ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КАРОТИНОИДОВ	77
3.1 Выбор индивидуальных каротиноидов и сырьевых источников для их получения	80
3.2 Обоснование влажности, режима сушки, типа измельчения сырья и экстрагентов	81
3.3 Предварительный выбор условий экстрагирования каротиноидов	88

3.4. Обобщенный способ получения каротиноидов	92
3.5 Оптимизация процесса получения индивидуальных каротиноидов методом математического планирования эксперимента	94
3.6 Частные способы получения каротиноидов	105
3.6.1 Разработка условий экстракции каротиноидов в присутствии хлорофиллов	105
3.6.1.1 Установление товароведческих показателей исходного сырья	108
3.6.1.2 Получение экстракта из листьев крапивы, содержащего суммарную фракцию каротиноидов и хлорофиллов	112
3.6.1.3 Определение количественного содержания каротиноидов и хлорофиллов в полученном суммарном экстракте	123
3.6.1.4 Выбор условий и разделение суммарного экстракта, содержащего каротиноиды и хлорофиллы	124
3.6.2. Особенность получения каротиноидов из сырья животного происхождения на примере астаксантина	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 3	135
ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИИ АНАЛИТИЧЕСКОГО СОПРОВОЖДЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ КАРОТИНОИДОВ	137
4.1 Анализ каротиноидов методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса	137
4.2 Идентификация каротиноидов методом масс-спектрометрии	142
4.3 Идентификация каротиноидов методом ИК-спектроскопии	153
4.4 Анализ субстанций каротиноидов методом УФ-спектрофотометрии	158
4.5 Анализ каротиноидов хроматографическими методами	161
4.5.1 Установление подлинности субстанций каротиноидов методом тонкослойной хроматографии	161
4.5.2 Контроль содержания остаточных растворителей методом газожидкостной хроматографии	163

4.5.3 Анализ каротиноидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографией	167
4.6 Количественное определение каротиноидов в субстанциях	170
4.7 Обобщенный подход к анализу каротиноидов	171
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 4	176
ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СТАБИЛИЗАЦИИ СУБСТАНЦИЙ КАРОТИНОИДОВ И ПОЛУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ИХ ОСНОВЕ	178
5.1 Выбор способа стабилизации индивидуальных каротиноидов	178
5.1.1 Выбор метода и условий микрокапсулирования индивидуальных каротиноидов	179
5.1.2 Технология получения микрокапсул с каротиноидами	201
5.2 Результаты изучения стабильности микрокапсулированных субстанций каротиноидов	204
5.3 Получение и анализ капсул на базе микрокапсулированных субстанций каротиноидов	210
5.3.1 Технология получения капсул, содержащих каротиноиды	210
5.3.2 Показатели качества капсул с каротиноидами	214
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 5	222
ГЛАВА 6 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБОВ АНАЛИЗА И ТЕХНОЛОГИИ ОБЛЕПИХОВОГО МАСЛА	224
6.1 Исследование каротиноидного состава облепихового масла	224
6.2 Использование метода УФ-спектрофотометрии в анализе образцов облепихового масла	228
6.2.1 Анализ образцов облепихового масла, полученных по отличающимся технологиям и различными производителями (растворитель – гексан)	230
6.2.2 Анализ образцов облепихового масла, полученных по отличающимся технологиям, различными производителями (растворитель – петролейный эфир)	237

6.3 Анализ образцов облепихового масла методом ТСХ	245
6.3.1 Условия проведения ТСХ-анализа образцов облепихового масла	245
6.3.2 Результаты ТСХ-анализа образцов облепихового масла в подвижной фазе I	246
6.3.3 Результаты анализа образцов облепихового масла методом ТСХ в системе растворителей II	247
6.3.4 Результаты анализа образцов облепихового масла методом ТСХ в системе растворителей III	249
6.3.5 Результаты анализа образцов облепихового масла методом ТСХ в системе растворителей IV	250
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 6	253
ГЛАВА 7 СОВМЕЩЕННАЯ МЕТОДОЛОГИЯ ИЗУЧЕНИЯ КАРОТИНОИДОВ И СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ИХ ОСНОВЕ В НОТАЦИИ IDEF0	255
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 7	275
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	276
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	278
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	280
ПРИЛОЖЕНИЯ	341

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

БАВ – биологически активные вещества

БАД – биологически активные добавки к пище

ВВ – вспомогательные вещества

ВИНИТИ РАН – Всероссийский институт научной и технической информации
Российской академии наук

ВМС – высокомолекулярные соединения

ВР – вспомогательные работы

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ГЛФ – готовая лекарственная форма

ГЭЦ – гидроксипропилцеллюлоза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИК – инфракрасная область спектра

ИЮПАК – Международный союз теоретической и прикладной химии

КХ – колоночная хроматография

ЛВ – лекарственное вещество

ЛП – лекарственный препарат

ЛС – лекарственные средства

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ЛФ – лекарственные формы

МК – микрокапсулы

МЦ – метилцеллюлоза

НД – нормативный документ

ПВП – поливинилпирролидон

ПВС – поливиниловый спирт

ПФ – подвижная фаза

РАН – Российская академия наук

СО – стандартный образец

ТП – технологический процесс

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТУ – технические условия

УМО – упаковка, маркировка, отгрузка

УФ – ультрафиолетовая область спектра

ФЗП – федеральная целевая программа

Ч.д.а. – чистый для анализа

ЭДТА – этилендиаминтетра ацетат (трилон Б)

ЭЦ – этилцеллюлоза

ЯМР – спектроскопия ядерного магнитного резонанса

ЕМЕА – Европейское агентство лекарственных средств, Великобритания, Лондон

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США

IDEF0 – Integration definition for function modeling – методология создания функциональной модели, основанная на графическом представлении производственных систем или среды

SADT – Structured Analysis and Design Technique – технология структурного анализа и проектирования

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 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 [1]. Так, О.В. Северцевой (2000 г.) разработаны и изучены биофармацевтические и технологические аспекты создания ЛФ препаратов из каротиноидсодержащих растений [2]. С.В. Первушкиным (2000 г.) были проведены комплексные исследования ЛС, содержащих сумму природных БАВ, в том числе и каротиноидов [3]. В 2001 г. А.В. Сергиенко было проведено фармакологическое обоснование использования ЛФ с β -каротином в условиях экспериментальной патологии [4]. В.В. Шелестовой (2002 г.) изучались аналитические возможности стандартизации ЛС, содержащих β -каротин и ликопин [5]. Исследования по разработке методологии микробиологического синтеза β -каротина и ликопина в 2004 г. были проведены А.С. Гавриловым [6]. 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 [7, 8, 9].

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 β -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.

ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КАРОТИНОИДОВ

1.1 Социально-медицинская значимость каротиноидов

На заседании Рабочей группы Министерства образования и науки РФ по реализации мероприятий в рамках ФЦП «Развитие медицинской и фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 и дальнейшую перспективу» были выделены и утверждены основные подходы к созданию инновационных лекарственных средств. Среди нескольких приоритетных направлений, отражающих разработку инновационных ЛС, необходимо отметить создание новых лекарственных препаратов на основе веществ природного происхождения [10].

В качестве общей тенденции развития современной фармации, фармакологии и медицины можно отметить постепенный переход к индивидуальным химическим соединениям и фармацевтическим субстанциям растительного происхождения, обуславливающим специфическую активность природных ЛС.

Внедрение такого подхода в процесс разработки передовых ЛС согласуется с основным принципом, которым руководствуются регуляторные органы Евросоюза – ЕМЕА и США – FDA при регистрации ЛС: «регистрация возможна только для ЛС с достоверно доказанными механизмом действия и установленными токсическими эффектами» [11, 12].

В Российской Федерации перспективность создания ЛС, содержащих индивидуальные химические вещества природного происхождения, подтверждается спросом на эту группу ЛС, что объясняется опытом многих поколений и ментальностью российского потребителя [13, 14].

Развитие любого научного концепта в области фармации, как правило, связано с решением круга вопросов, охватывающих группу БАВ. Современный

уровень изученности каротиноидов как группы БАВ переводит этот класс соединений из группы «интересных для исследования пигментов» в группу перспективных БАВ с точки зрения медико-биологического и фармацевтического использования [15-18].

Необходимо отметить, что практически все заявленные для каротиноидов фармакологические эффекты [19-22] прямо или опосредованно реализуются через их влияние на иммунную систему. Эволюционно живые организмы выработали механизмы, нивелирующие или предохраняющие клетки от агрессивного окисления за счет атак синглетного кислорода и свободных радикалов. Электронно-насыщенный фрагмент структуры каротиноидов обуславливает максимальную восстановительную емкость, что приводит к их окислению в реакциях со свободными радикалами. Большинство каротиноидов принимает и рассеивает энергию с синглетного кислорода, передавая ее по системе сопряженных связей. Такой эффект возможен при наличии в молекуле не менее семи сопряженных двойных связей [23-26].

Способность каротиноидов «гасить» синглетный кислород служит доказательством их антиоксидантной активности, которая напрямую зависит от их электронного строения и влияния на свойства мембран [27, 28]. Каротиноиды участвуют в улавливании и передаче сигналов, вызывающих движение белков в мембране, воздействуя на модификацию ее структуры и динамику [29, 30].

Адресность антиоксидантного действия каротиноида зависит от его структуры и места образования свободных радикалов. Например, молекулы β -каротина и ликопина, структурированные во внутренней гидрофобной части бислоя мембраны, эффективны только в отношении свободных радикалов, порожденных в этом внутреннем ядре. В отличие от неполярных каротинов лютеин и астаксантин, ориентированные гидроксигруппами в полярные внешние зоны мембран, защищают ее от повреждений радикалами, образовавшимися в водной фазе [29-32].

Баланс уровня АФК, которым принадлежит ведущая роль в регуляции клеточного иммунитета, поддерживается с помощью эндогенных и экзогенных

антиоксидантов, к которым относят и каротиноиды [33, 34]. Ликвидируя избыточные токсичные формы АФК, каротиноиды в то же время сохраняют их физиологический уровень, необходимый для клеточной сигнализации.

Одной из «мишеней» АФК являются митохондрии, в которых происходит их основной синтез. Локализация каротиноидов в мембранах митохондрий позволяет им участвовать в защитной реакции мембран в ответ на окислительное воздействие АФК [29, 35, 36].

Исследование ликопина *in vitro* свидетельствует о возможности его применения с целью контроля над хроническими иммунными и воспалительными процессами, что достигается за счет замедления созревания дендритных клеток [37]. Результаты рандомизированных двойных слепых клинических исследований показали, что каротиноиды, в частности ликопин, лютеин, астаксантин, способствуют защите иммунной системы от окислительного повреждения и тем самым стимулируют иммунный ответ [38, 39].

Как известно, при интенсивных и длительных физических нагрузках оксидантный стресс, вызываемый АФК, значительно усиливается, что сопровождается понижением уровня Т-лимфоцитов. Экспериментально доказано, что каротиноиды способствуют восстановлению начального уровня содержания Т-лимфоцитов, а также сокращению окислительных повреждений ДНК [40].

Дисбаланс АФК является основной причиной нейродегенеративных, сердечно-сосудистых, глазных заболеваний и злокачественных новообразований [41].

С возрастом наблюдается снижение эффективности иммунной системы, при этом повышается восприимчивость к инфекциям и другим нозологиям. «Теория старения митохондрий» объясняет это тем, что в митохондриях за весь период жизни накапливаются продукты окисления ДНК, белков и липидов [41]. Установлено, что введение в рацион пожилых людей даже небольших количеств каротиноидов может восстановить возрастное снижение как клеточного, так и гуморального иммунитета до уровня более молодого возраста [42]. Так, в ходе проведения рандомизированных двойных слепых исследований у пожилых лиц,

принимающих пищу с добавлением α -каротина, β -каротина, криптоксантина, ликопина, лютеина или зеаксантина, наблюдалось снижение заболеваемости острыми респираторными заболеваниями по сравнению с контрольной группой с низким потреблением этих веществ [43].

Многочисленные данные свидетельствуют об участии окислительного повреждения молекул и нарушений энергетического обмена в развитии болезни Альцгеймера [44, 45]. Оксидантный стресс синовиальной оболочки является одной из причин ревматоидного артрита [46, 47]. Перечисленные факты позволяют сделать вывод о том, что каротиноиды могут использоваться в целях профилактики в соответствующих группах риска.

Важным аспектом влияния каротиноидов на иммунитет является их ингибирующее влияние на развитие опухолей. В экспериментах *in vivo* доказано, что β -каротин приостанавливает развитие фибросаркомы за счет увеличения иммунных реакций [48], астаксантин по сравнению с β -каротином и кантаксантином проявляет более высокую ингибирующую активность по отношению к клеткам опухоли [49], а лютеин оказывает тормозящее действие на развитие опухоли молочной железы [50]. Кроме того, установлено, что ликопин и β -каротин *in vitro* ингибировали рост клеток рака молочной железы [51].

Несмотря на обширный и репрезентативный экспериментальный материал, накопленный научным сообществом, следует констатировать, что на настоящий момент отсутствуют сведения по изучению специфического действия индивидуальных каротиноидов на иммунную систему. Этот факт можно объяснить тем, что в исследованиях преимущественно используется трудноразделяемый на индивидуальные вещества комплекс каротиноидов с доминированием одного из них.

Для получения достоверных данных по фармакологической активности индивидуальных каротиноидов необходимо иметь в наличии экономически эффективную технологию, позволяющую обеспечить наработку доступных по себестоимости и качеству образцов индивидуальных каротиноидов практически из любого сырья.

1.2 О структурных особенностях каротиноидов

Будучи изопреноидами, каротиноиды составляют группу тетратерпенов, базовой структурой которых является углеводород $C_{40}H_{56}$ с системой сопряженных кратных связей из девяти виниленовых фрагментов (Рисунок 1.1).

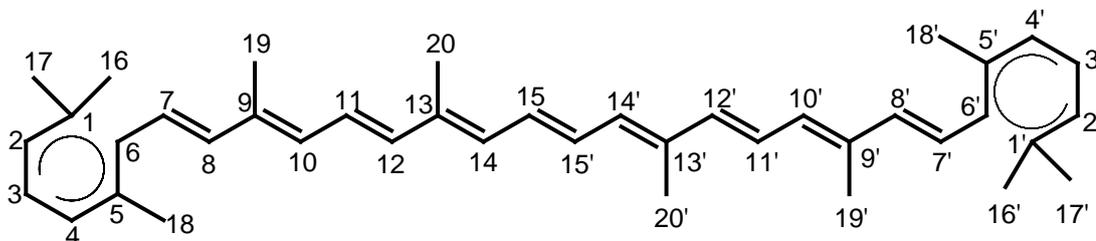


Рисунок 1.1 – Структура углеводорода $C_{40}H_{56}$

Представители этого класса БАВ, как правило, имеют ациклические или циклические концевые фрагменты [52, 53].

Каротиноиды делят на две группы: I – каротины, представляющие собой углеводороды, например: β -каротин, α -каротин, ликопин (Рисунок 1.2),

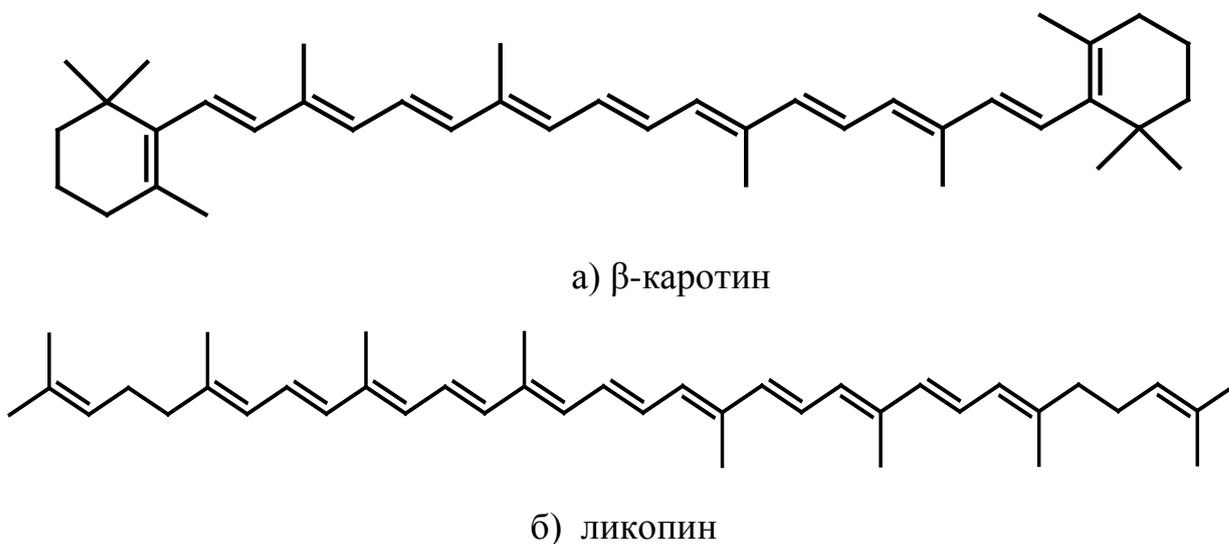
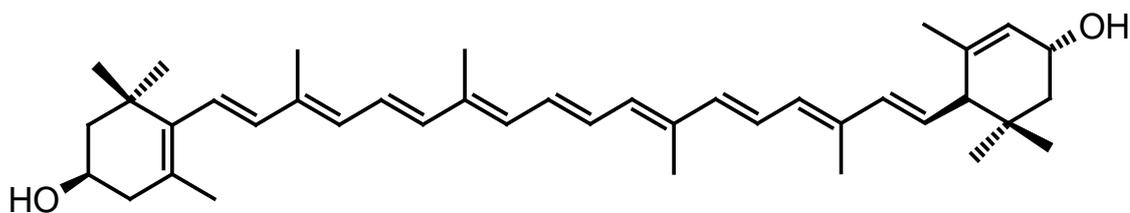


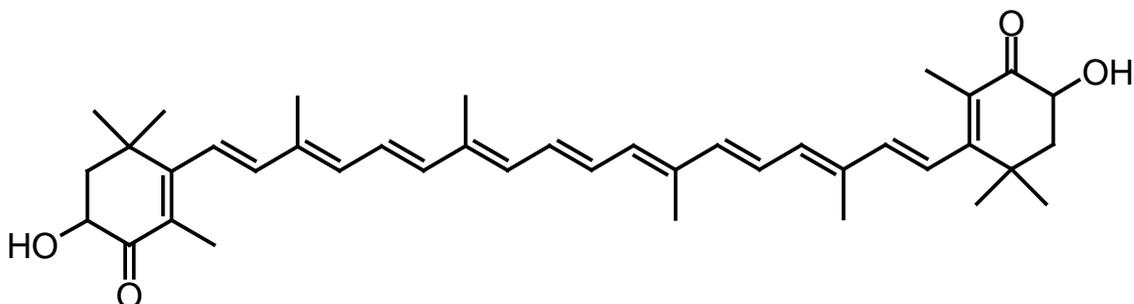
Рисунок 1.2 – Структурные формулы некоторых каротинов:

β -каротина (а), ликопина (б)

II – кислородсодержащие производные каротинов, являющиеся группой ксантофиллов, представители которой лютеин, зеаксантин, астаксантин и др. (Рисунок 1.3) [54, 55].



а) лютеин



б) астаксантин

Рисунок 1.3 – Структурные формулы некоторых ксантофиллов:
лютеина (а), астаксантина (б)

Различия в физических, химических, а также биологических свойствах каротиноидов объясняются существованием изомеров каротиноидов.

Около 75% всех известных каротиноидов являются хиральными, из которых наибольшее количество приходится на долю C40 каротинов и их C30 *apo*- (аро-) или *diapo*- (диаро-) производных, а также ациклических ксантофиллов. Наличие хиральных центров обуславливает существование энантиомеров, например: (3*R*,3'*R*) астаксантин и (3*S*,3'*S*) астаксантин. Для некоторых каротиноидов характерно наличие *мезо*-форм, в структурах которых имеет место внутренняя симметрия, т.е. существование внутреннего энантиомера (Рисунок 1.4) [56, 57].

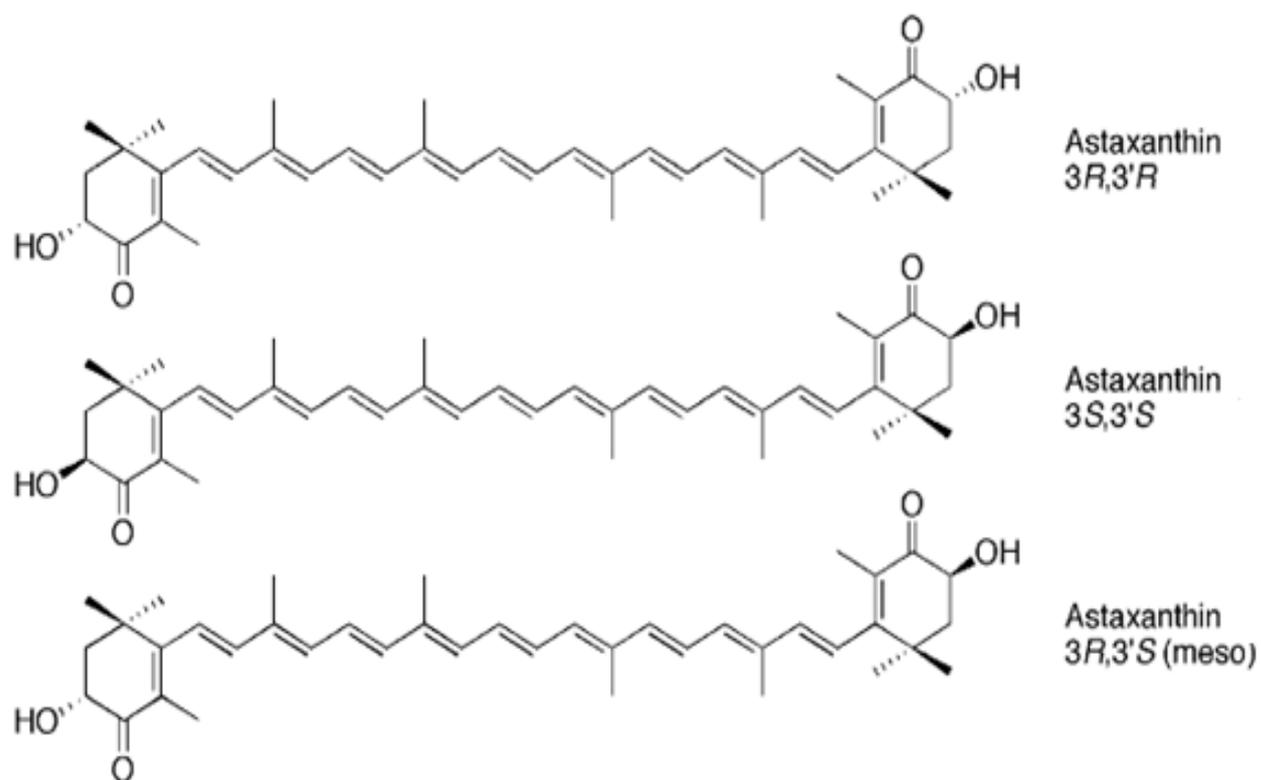


Рисунок 1.4 – Структура энантиомеров астаксантина и его *мезо*-формы [55]

Для каротиноидов характерна и геометрическая изомерия, обусловленная различным расположением заместителей относительно плоскости кратных связей в полиеновой цепи [55].

По номенклатуре ИЮПАК для каротиноидов принято обозначение *цис*- (*cis*-), *транс*- (*trans*-) или *Z/E* системы (Рисунок 1.5). Иногда *транс-E* и *цис-Z* могут не совпадать, как это имеет место в случае кислородсодержащих заместителей в полиеновой цепи [52].

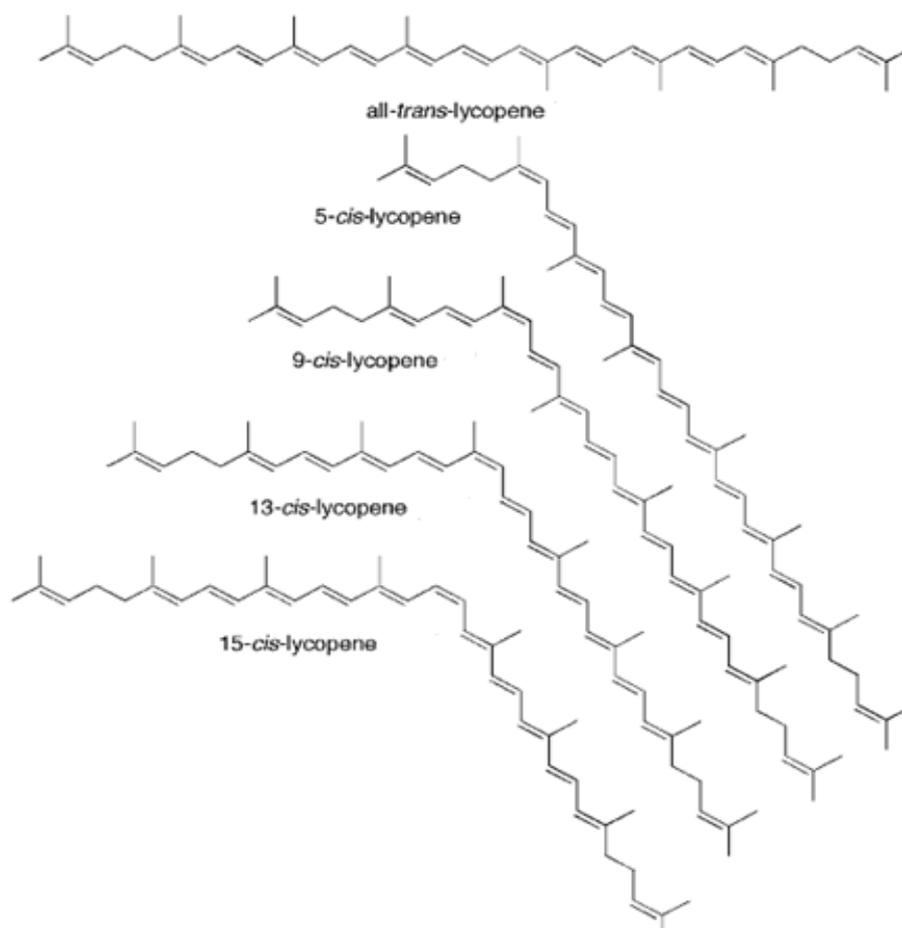


Рисунок 1.5 – Структура *транс*- и *цис*-форм ликопина [55]

В отличие от оптических геометрические изомеры каротиноидов легко переходят из одной формы в другую, чаще всего из *Z*-формы в *E*-форму. Изомеризация может быть инициирована нагреванием, воздействием света, а в некоторых случаях эффектом растворителя и механическим воздействием [58]. Количество выделяемых *Z*-изомеров всегда меньше, чем *E*-изомеров. При разработке технологии получения необходимо учитывать возможную взаимную трансформацию изомеров, поэтому следует проводить оптимизацию таких факторов, как температура, воздействие света, действие кислот, катализаторов и др. [59].

Перспективность исследований в этом направлении подтверждается тем, что цисоидная конфигурация каротиноидов не только играет существенную роль в фотосинтезе, но и определяет биологическую доступность, которая, вероятно, у них выше, чем у *транс*-форм. Немаловажным является и то, что для

каротиноидов возможна изомеризация в биологических средах, которую можно избежать использованием низкотемпературного режима и минимального воздействия света в процессе получения и хранения каротиноидов [53, 58].

Учет закономерностей взаимопревращения *цис*- и *транс*-изомеров каротиноидов и оптимизация технологических параметров могут существенно повысить эффективность исследований по получению индивидуальных каротиноидов в виде фармацевтических субстанций и созданию ЛС на их основе.

1.3 Нормы потребления основных каротиноидов и их содержание в различных природных источниках

В соответствии с рекомендациями по уровню потребления БАВ [60] основными нутриентами из класса каротиноидов являются β -каротин, ликопин, лютеин, зеаксантин и астаксантин. В таблице 1.1 показано, каковы основные природные источники этих соединений и нормы адекватного и верхнего допустимого суточного уровня потребления этих индивидуальных каротиноидов. Таблица 1.1 – Природные источники и нормы потребления некоторых каротиноидов [60]

Индивидуальный каротиноид	Традиционный пищевой природный источник	Норма адекватного потребления	Верхний допустимый уровень потребления
β -Каротин	морковь, петрушка, укроп, лук, абрикосы, тыква, облепиха, томаты, рябина, шиповник	5 мг	10 мг
Ликопин	тыква, томаты, красный перец сладкий, арбуз, папайя	5 мг	10 мг
Лютеин	капуста, кабачки, шпинат, кресс-салат, петрушка, зеленый горошек, зеленый перец сладкий, шиповник	5 мг	10 мг
Астаксантин	лососевые рыбы, крабы	2 мг	6 мг

В то же время в качестве альтернативных источников в [60] приводятся субстанции четырех каротиноидов, полученных путем химического синтеза. Для β -каротина, ликопина как альтернатива природным источникам рекомендованы

субстанции, полученные биотехнологически [60]. Еще одним источником астаксантина является водоросль *Haematococcus pluvialis* (геманококкус), для которой основной территорией культивирования являются Гавайские острова [31, 32]. Очевидно, что с позиций доступности сырья и применительно к отечественному климату традиционные источники каротиноидов являются более привлекательными и для технологов, и для потребителя.

Каротиноиды являются одним из древнейших классов соединений, которые синтезируются представителями растительного мира. В этой связи практически не существует растительных объектов, не содержащих каротиноиды [3, 6, 8, 9]. Известны растения, для которых лишь показано присутствие в них каротиноидов [61-65], и при этом существуют объекты с установленным уровнем содержания конкретных представителей этого класса соединений [66-71]. Поэтому в эксперименте в качестве источников получения индивидуальных каротиноидов мы использовали только те, которые входят в последнюю группу [72-75]. Кроме того, принималось во внимание, какой индивидуальный каротиноид для каждого вида сырья является доминантным (Таблица 1.2).

Таблица 1.2 – Содержание каротиноидов в различных природных источниках [61-63, 66-75]

Сырье	Содержание каротиноидов, мг%	Выделяемый каротиноид
Мякоть плодов тыквы (свежее сырье)	от 2 до 28	β -каротин
Корнеплоды моркови ($W \leq 15\%$)	до 160	β -каротин
Плоды облепихи свежие ($W \leq 87\%$)	не менее 90	β -каротин
Томаты (свежее сырье)	от 6,4 до 150	ликопин
Продукты переработки томатов ($W \leq 15\%$)	до 70	ликопин
Панцири креветок ($W \leq 15\%$)	до 15	астаксантин
Лист крапивы (воздушное сырье) ($W \leq 14\%$)	от 24 до 50	лютеин

Растительные объекты, например: свежие томаты, морковь, тыква, облепиха – являются наиболее традиционными промышленными источниками получения как индивидуальных каротиноидов, так и препаратов, основные

фармакологические свойства которых обусловлены суммарным содержанием этих БАВ. Важнейшим источником каротиноидов, запасы которого довольно значительны, являются гидробионты, в частности панцирные отходы креветки, содержащие астаксантин [31, 73, 76, 77].

Изучение растительного сырья с использованием новых аналитических и технологических подходов позволяет расширять арсенал источников каротиноидов, а именно использовать природные объекты, применяемые для получения других групп БАВ. Например, лист крапивы является признанным источником получения витамина К, содержание которого по данным разных авторов составляет до 4 мг/%, в то же время суммарное содержание каротиноидов в этом виде сырья в некоторых случаях превышает 50 мг/% [66, 74, 75, 78].

Поскольку каротиноиды являются неотъемлемыми участниками процесса фотосинтеза, то их «обязательное соседство» с хлорофиллами является одной из технологических сложностей получения индивидуальных каротиноидов. Основным каротиноидом листьев крапивы является лютеин [66, 74], поэтому этот вид сырья мог быть интересен в качестве модельного объекта, для изучения возможности получения каротиноидов при их совместном присутствии с хлорофиллами.

Каротиноиды, будучи природными соединениями, синтезируются исключительно растительными организмами и некоторыми грибами [55, 116]. Астаксантин накапливается в животных организмах за счет метаболической трансформации других каротиноидов.

Биосинтез астаксантина пока доказан только для горицвета весеннего (*Adonis vernalis* L.), имеющего красную окраску лепестков. В цитоплазме клеток водоросли *Haematococcus Pluvialis* накапливается астаксантина до 1%, причем это происходит при формировании экстремальных условий существования, например, в засуху, при изменениях температуры за пределы критических значений, повышенном воздействии УФ-лучей, недостатке азота и др. [31, 32].

Организмы животных и человека способны осуществлять трансформацию одних каротиноидов в другие или в соединения, близкие к ним по структуре,

например, в человеческом организме β -каротин расщепляется на 2 моля витамина А.

Фламинго, употребляя в пищу водоросли, содержащие лютеин и зеаксантин, метаболизируют из них астаксантин и кантаксантин, которые придают красно-розовую окраску их оперению. Этот процесс характерен и для некоторых других птиц [31]. Кроме того, достаточное количество астаксантина накапливается в организмах морских и пресноводных гидробионтов, а рыбы накапливают астаксантин, получая его с пищей. Интересным является то, что различные изомеры астаксантина по-разному кумулируются, например, E-астаксантин избирательно накапливаются в мышцах и плазме рыб, а 13Z-астаксантин в печени лососевых рыб. Необходимо учитывать, что каротиноиды мяса рыб, например: кижуча, нерки, лосося и др. – это астаксантин в свободном, неэтерифицированном виде [31, 55, 72], хотя до 90 % природного астаксантина других гидробионтов – это продукт этерификации каротиноида-ксантофилла и жирных кислот.

Особенность накопления астаксантина в животных организмах и его биотрансформация позволяют выбрать его как модельный каротиноид животного происхождения для дальнейших экспериментальных исследований.

1.4 Технологические подходы к получению каротиноидов

Субстанции каротиноидов, как правило, получают методом микробиологического или химического синтеза, а также экстракцией из природного сырья.

Процесс биосинтеза каротиноидов подробно описан в работе [79], исследования по его модернизации и оптимизации приведены в источниках [80-82].

Традиционно в качестве продуцентов каротиноидов исследователи используют грибы, например *Blakeslea trispora* и дрожжи, принадлежащие роду *Phaffia*, в частности *Phaffia rhodozyma*. Набор продуцентов значительно

расширяется за счет генной модификации штаммов и использования других культур. С целью интенсификации синтезирующей активности на первом этапе, как правило, получают генно-модифицированные штаммы бактерий, грибов, водорослей или растений с применением различных мутагенных факторов [83-86]. Некоторые авторы [87-90] для повышения выхода каротиноидов, помимо генетической модификации продуцентов, предлагают вводить в культуральную среду вещества, стимулирующие синтез каротиноидов, например: источники углерода, азота, растительное масло, аминотетилпиридины, табачную крошку.

Биотехнологическое производство каротиноидов строго регламентирует применение разрешенных к использованию штаммов культур-продуцентов и соблюдение специальных условий для содержания штаммов. Наиболее проблемным в этом способе выделения каротиноидов является сложность получения химически чистого конечного продукта, в частности, наличие в готовом продукте изомеров, полупродуктов микробиологического синтеза и др. Решить эти задачи можно методами генной инженерии, но этот подход привлекателен, как правило, для научных исследований.

Поскольку схемы химического синтеза каротиноидов характеризуются достаточной сложностью, то они не нашли широкого практического применения. Однако с позиций расширения научного знания в этой области интерес представляют работы по синтезу кантаксантина и астаксантина. Они основаны на реакции окисления β -каротина до кантаксантина, а лютеина и зеаксантина – до астаксантина [91]. Нельзя не учитывать то, что этот способ получения каротиноидов также не исключает «загрязнения» примесями изомеров целевого продукта. Так, при химическом синтезе астаксантина образуется целевой продукт, загрязненный его же изомерами [92]. Контролировать и регулировать данный процесс на стадии лабораторных экспериментов достаточно сложно, а в условиях производства это может привести к удорожанию технологии получения, что всегда нежелательно с точки зрения коммерциализации. Еще одним недостатком химически синтезированных каротиноидов является их высокая аллергенность в сравнении с природными.

В контексте решения практических задач чаще всего индивидуальные каротиноиды выделяют экстракцией из природных источников. Поскольку каротиноиды являются малополярными соединениями, то для их экстракции используют хлорметан [93], смеси н-гексана и бутанола [94], н-гексана и ацетона [95], хлороформ [96], ацетон и спирт этиловый [75, 76].

Традиционными промышленными источниками каротиноидов и препаратов на их основе являются свежие плоды облепихи, шиповника, томаты, корнеплоды моркови, мякоть плодов тыквы, цветки календулы и др. [97, 98], причем этот перечень постоянно расширяется [99, 100].

Опубликованы данные о возможности использования в качестве источника каротиноидов зеленой массы амаранта багряного (*Amarantus cruentu L.*, сем. *Amarantaceae*), в качестве селективного экстрагента предложено применять смесь н-гексан – бутанол в соотношении 95:5. Показано, что максимальное количество каротиноидов извлекается из жома свежих листьев [94].

При изучении химического состава серпухи венценосной из сырья после предварительного омыления сырья 5% спиртовым раствором щелочи были изолированы каротиноиды с применением в качестве экстрагента н-гексана [95].

Из отходов переработки пихтовой лапки каротиноиды выделяли, используя метод препаративной хроматографии [96].

В патенте РФ предложен способ получения ксантофиллов из лепестков цветков бархатцев, экстракцией н-гексаном или петролейным эфиром при комнатной температуре [101].

Описан способ разработки концентрата каротиноидов, предусматривающий экстракцию сухого измельченного жома плодов рябины обыкновенной *Sorbus aucuparia L.* 4-кратным объемом дихлордифторметана в течение 3 ч [102].

Известны данные по технологии получения суммы каротиноидов из плодов и семян таких пищевых растений, как абрикос, персик, грейпфрут, апельсин, виноград, дыня, папайя, гуайява, кофе, соя, листья зеленого чая, какао.

Конечный продукт содержит сумму каротиноидов: фитофлюен или фитоен, β -каротин, ликопин, зеаксантин, β -криптоксантин, капсантин, лютеин [103].

Имеются сведения о создании линии безотходной переработки облепихи, позволяющей получить концентрат облепихового масла, содержащий, в зависимости от сырья, от 280 до 530 мг% каротиноидов в пересчете на β -каротин [104].

Богатым источником каротиноидов являются гидробионты [105, 106]. В качестве сырья для получения астаксантина наиболее часто используют панцирные отходы креветки, где содержание астаксантина достигает до 15 мг%, а в некоторых случаях 18 мг% [107].

Все исследования по получению каротиноидов из гидробионтов проводятся по единой схеме, но методики, как правило, отличаются составами экстрагентов и растворителей, из которых происходит перекристаллизация каротиноидов [76, 77, 108]. Необходимо отметить, что все описанные технологические схемы также позволяют получать сумму каротиноидов с преобладанием в конечном продукте астаксантина.

Решение задач по стабилизации каротиноидов осуществляется, как правило, путем концентрирования и диспергирования их в различных гидрофобных носителях или пищевых растительных маслах: рапсовом, кукурузном, подсолнечном, соевом или пальмоядровом, которые препятствуют воздействию экзогенных факторов [109-111]. Другим распространенным вариантом стабилизации каротиноидов можно считать применение антиоксидантов на различных стадиях получения [112]. Еще одним направлением повышения стабильности является получение солюбилизованных растворов каротиноидов [113].

Очевидно, что обширный практический материал, отражающий получение каротиноидов путем экстракции, требует теоретической систематизации для дальнейшей разработки унифицированного подхода к получению индивидуальных каротиноидов.

1.5 Состояние и перспективы анализа каротиноидов

Получение и стандартизация каротиноидов, разработка ЛС на их основе, проведение фармацевтических, биотехнологических, фармакологических исследований должны характеризоваться высокой степенью достоверности, что достигается использованием современных научно-обоснованных подходов к анализу этого класса БАВ.

Выделение каротиноидов из природных источников непосредственно связано с доказательством их структуры. Изучение строения выделенных впервые, а также уже известных природных соединений, в том числе и каротиноидов, проводится, как правило, методом ЯМР. Данный метод является наиболее информативным для установления структуры любого вещества [114, 115]. В монографии Г. Бриттона с соавторами [116] приведена наиболее полная информация о ЯМР-спектрах более 500 каротиноидов. Аппаратурная сложность метода и стоимость анализа пока не позволяют масштабировать его в качестве метода контроля качества ЛС, включаемого в НД, однако метод является фармакопейным и незаменим на этапе доклинических испытаний фармацевтических субстанций [117].

Достаточно часто для установления подлинности известных представителей этого класса или идентификации новых индивидуальных каротиноидов используют метод ИК-спектроскопии, позволяющий подтверждать структурные фрагменты и функциональные группы [92, 96] исследуемых веществ.

Все чаще для анализа каротиноидов исследователи применяют методы ближней ИК-спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния (Raman-спектроскопия) [96, 118, 119].

Метод ИК-спектроскопии, являясь фармакопейным, информативным и используемым для идентификации фармацевтических субстанций органической природы [117], может быть включен в НД, регламентирующие качество субстанций каротиноидов.

В современных условиях аппаратурная доступность позволяет проводить исследования каротиноидов фармакопейным методом масс-спектрометрии, используя его как самостоятельный метод, так и в сочетании с ВЭЖХ [120-122].

Максимально широко для идентификации [123-125], исследования степени чистоты [126] и количественного содержания каротиноидов [127-159] используется фармакопейный метод спектрофотометрии в УФ- и видимой областях [130, 131].

Полиеновая структура каротиноидов обуславливает интенсивное поглощение электромагнитного излучения в интервале от 400 до 500 нм [53]. Для выраженного избирательного поглощения в видимой области необходимо, чтобы молекула каротиноида содержала полиеновую цепь не менее чем из 7 двойных связей. Причем, чем длиннее система сопряженных связей, тем сильнее bathochromное смещение максимумов поглощения [116, 130, 131].

Каротиноиды идентифицируют, как правило, по положениям максимумов светопоглощения, которые варьируют в зависимости от длины полиенового фрагмента, наличия в структуре циклических концевых групп, стерических эффектов, природы используемого растворителя и др. [53, 116, 130]. Спектры поглощения каротиноидов в большинстве случаев характеризуются наличием трех максимумов поглощения или двух максимумов поглощения и плеча. Однако электронные спектры некоторых каротиноидов, например астаксантина и гантаксантина, имеют по одной полосе поглощения [53, 116, 131].

На характер спектра поглощения кроме длины полиеновой цепочки, оказывает влияние число концевых фрагментов, что можно охарактеризовать следующей зависимостью: увеличение количества сопряженных связей и уменьшение числа концевых циклов, способствуют bathochromному сдвигу всех максимумов поглощения. В то же время увеличение числа циклических фрагментов при равном количестве сопряженных связей, как правило, приводит к смещению максимумов в коротковолновую область (hypsochromный сдвиг). Таким образом, положения максимумов поглощения могут служить базовой информацией при изучении структуры каротиноидов. Кроме того, столь

индивидуальный профиль спектров каротиноидов является приемлемым параметром для их идентификации. При этом зарегистрировать «идеальный» спектр каротиноида достаточно сложно, т.к. это требует выделения образцов высокой степени чистоты.

Г. Бриттоном предложено решение этой задачи путем определения соотношения максимумов оптической плотности [53, 116] исследуемого вещества (Рисунок 1.6).

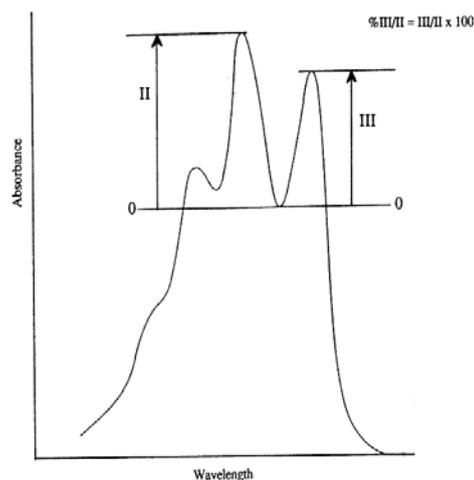


Рисунок 1.6 – Определения соотношения III/II,% [53, 116]

С этой целью рассчитывают соотношение высот третьего максимума поглощения (III) ко второму (II). Полученное значение выражают в процентах, считая базовой линией прямую, проведенную через минимум между изучаемыми максимумами оптической плотности. Значение данной характеристики электронного спектра индивидуального каротиноида зависит от используемого растворителя. Так, соотношение III/II для β -каротина в петролейном эфире составляет 25%, а в ацетоне – 15%. Эта характеристика позволяет не только установить подлинность индивидуальных каротиноидов, но и судить предварительно об их чистоте [130, 131].

В фармацевтическом анализе метод спектрофотометрии также достаточно широко использует для идентификации каротиноидов [132-135].

В частности, описан качественный анализ этих соединений в сравнении с СО каротиноидов [119, 136-138]. При отсутствии СО индивидуальных каротиноидов или изучении суммы каротиноидов исследователи в большинстве

случаев прибегают к установлению подлинности по положению всех трех максимумов оптической плотности [121, 122]. Г. Бриттон с соавторами [23, 116, 130] рекомендует проводить подтверждение подлинности каротиноидов по трем максимумам поглощения и сравнивая спектры поглощения одного и того же каротиноида в нескольких растворителях, что значительно увеличивает достоверность результатов.

Метод УФ-спектрофотометрии чаще других применяется для количественного анализа каротиноидов.

Суммарное количественное содержание каротиноидов было определено по удельному показателю поглощения β -каротина в биомассе водоросли спирулины (*Spirulina platensis* (Nords.) Geilt.) в гексане [133], хлороформной фракции из шрота зелени пихты сибирской (*Abies sibirica* Lb.) [96], ацетоновом экстракте из корнеплодов моркови (*Daucus carota* subsp. *sativus* L.) [129] и извлечении из плодов облепихи крушиновидной (*Hippophae Rhamnoides* L.) [134], экстракте какалии копьевидной (*Cacalia hastate* L.) сухом [135].

Следует отметить вариабильность значений удельного показателя поглощения для β -каротина. Так, Первушкин С.В. с соавторами [133] для расчета суммы каротиноидов в биомассе водоросли спирулины (*Spirulina platensis* (Nords.) Geilt.) использовали значение удельного показателя поглощения β -каротина в гексане равное 2773. Юнусова Ф.М. с соавторами [134] в извлечении из плодов облепихи крушиновидной (*Hippophae Rhamnoides* L.) с применением в качестве экстрагента того же растворителя для расчета исследуемых веществ применяли показатель поглощения со значением – 2592. Определение суммарного содержания каротиноидов в сухом экстракте какалии копьевидной (*Cacalia hastate* L.) проводили по удельному показателю поглощения составляющему 2770 [135]. В то же время известен удельный показатель поглощения β -каротина в ацетоне – 2600, который был применен для расчета суммарного содержания каротиноидов в корнеплодах моркови (*Daucus carota* subsp. *sativus* L.) [129].

Чаще всего в ходе предварительного исследования содержание суммы каротиноидов пересчитывают на β -каротин, используя значение удельного показателя поглощения, который для раствора в гексан составляет 2592 [130, 131, 137]. В случае, когда известна величина удельного показателя поглощения для основного индивидуального каротиноида в объекте исследования [121], расчет содержания суммы каротиноидов проводится в пересчете на него, например на нейроспорин [125].

Спектрофотометрия в УФ- и видимой областях является фармакопейным методом, позволяет доказательно устанавливать подлинность, а в некоторых случаях и чистоту каротиноидов и чаще всего используется всеми исследователями в ходе изучения этого класса БАВ, не требует дорогостоящего и редкого аппаратного оснащения, поэтому в настоящее время он является основным фармакопейным методом анализа каротиноидов.

Изучение качественных и количественных характеристик растительного сырья невозможно без аналитического разделения комплекса БАВ. В этом контексте незаменимыми являются хроматографические методы анализа.

В связи с высокой молекулярной массой и термолабильностью каротиноидов варианты газовой хроматографии для их анализа, как правило, не используются. Метод ГЖХ используется только как метод контроля содержания остаточных растворителей [139].

Для разделения суммы каротиноидов на индивидуальные соединения чаще всего используется КХ. Обширная информация о возможности разделения каротиноидов данным способом представлена в ряде работ [53, 55, 130], где, например, описано разделение суммарных каротиноидных экстрактов на колонке с оксидом магния и использованием в качестве ПФ смесей, состоящих из ацетона и петролейного эфира в различном соотношении [53].

Традиционно предварительный анализ каротиноидного состава изучаемых объектов проводится с помощью ТСХ [140-143]. Основные трудности, с которыми сталкиваются исследователи при анализе каротиноидов этим методом, – это недостаточные селективность и воспроизводимость [142, 144]. Кроме того,

хроматографические условия ТСХ разделения каротиноидов не всегда являются эффективными при разделении их суммы на индивидуальные соединения [141, 143, 145]. Следует отметить, что данная проблема до конца не решена и в настоящее время [120, 144, 146].

Практически все исследователи используют хроматографические условия для ТСХ, опубликованные в источниках [53, 116, 130, 131]. Идентификация каротиноидов преимущественно проводится по факторам удерживания [132, 133, 141, 147]. Однако результаты, имеющие большую достоверность, получены при установлении подлинности каротиноидов по сравнению со СО этих соединений [120, 122, 148, 149].

На получение воспроизводимых результатов анализа методом ТСХ оказывает влияние множество факторов. В анализе каротиноидов используется нормально-фазовую адсорбционную ТСХ, т.к. разделение проводят на непривитых носителях типа силикагеля, оксида алюминия или оксида магния. Такой вариант обеспечивает достаточную селективность в случае разделения соединений с различным набором функциональных групп и структурных фрагментов, т.е. соединений значительно отличающихся по структуре. Это подтверждается результатами исследований по разделению суммы каротиноидов на подгруппы, а именно: каротины, ксантофиллы и производные ксантофиллов [141].

Необходимо отметить, что на эффективность разделения в нормально-фазовой ТСХ при анализе каротиноидов влияют наличие воды в хроматографической системе, степень насыщенности камеры парами ПФ, ее состав, тип элюирования, сорбента, техника нанесения пробы и др. Следовательно, для идентификации каротиноидов по величинам коэффициентов удерживания необходимо предельно точное воспроизведение хроматографических условий анализа. Важным в анализе каротиноидов является исключение воздействия света на хроматографическую систему и образцы. С этих позиций результаты ТСХ-анализа можно считать, главным образом, пилотными данными на предварительном этапе исследования этого класса БАВ. Однако при

наличии СО индивидуальных каротиноидов этот метод как фармакопейный может успешно применяться в анализе каротиноидов и ЛС на их основе. Другим вариантом повышения эффективности и достоверности анализа каротиноидов является использование варианта ВЭТСХ.

На современном этапе развития аналитических методов при изучении природных соединений наблюдается общая тенденция решать все задачи изолирования, идентификации и количественного определения БАВ методом ВЭЖХ, что определено широкими возможностями этого метода.

В анализе каротиноидов все чаще находит практическое применение следующая комбинация хроматографических методов: предварительные ТСХ-испытания, основной метод – ВЭЖХ [120, 122, 146]. Этот подход наиболее эффективен, т.к. для обращенно-фазовой ВЭЖХ хроматографическая подвижность каротиноидов достаточно хорошо согласуется с таковой при анализе методом ТСХ, хотя для нормально-фазовой ВЭЖХ последовательность элюирования каротиноидов может быть иной. Вместе с тем универсальность ВЭЖХ позволяет решать сложные аналитические задачи, связанные с изолированием, идентификацией и количественным определением каротиноидов в различных объектах.

Рассматривая применение ВЭЖХ при получении и анализе каротиноидов, можно выделить несколько направлений, по которым используется этот метод.

Метод ВЭЖХ позволяет практически одновременно осуществлять идентификацию, количественное определение и, при определенном техническом оснащении, изолировать индивидуальные каротиноиды, как из традиционно используемого для этих целей сырья [63, 150], так и из новых источников [64, 125, 151, 152].

С помощью метода ВЭЖХ осуществляется мониторинг процесса экстракции каротиноидов из различных объектов и коррекция уже традиционно существующих подходов к их получению [64, 129, 153, 154].

В связи с тем что в настоящее время в качестве продуцентов каротиноидов масштабно используются дрожжи, бактерии, водоросли [155-158], получило

развитие использования ВЭЖХ при изучении биосинтеза каротиноидов и связанного с ним контроля биотехнологического процесса.

Выведение на национальные фармацевтические рынки ЛП и БАД к пище, содержащих каротиноиды, требует проведения масштабных доклинических и клинических испытаний, что непосредственно связано с решением задач по анализу каротиноидов в различных биологических жидкостях и тканях. На этом этапе изучения каротиноидов метод ВЭЖХ является приоритетным [159-163]. Так, при изучении и выборе условий изолирования каротиноидов из сыворотки крови и тканей человека были применены два варианта ВЭЖХ: нормально-фазовый изократический и обращенно-фазовый градиентный методы [164-167]. Было установлено, что второй вариант оптимален для изолирования, разделения и анализа каротиноидов из таких объектов [168, 169].

Применение ВЭЖХ с целью разработки и стандартизации ЛС и БАД, содержащих каротиноиды, в научной литературе представлено чрезвычайно скудно [170-172]. В работе [170] для анализа каротиноидного состава «Бальзама облепихового» использовался нормально-фазовый вариант ВЭЖХ, градиентный режим элюирования и спектрофотометрический детектор. Авторы констатировали, что разделение α -каротина, β -каротина, γ -каротина и ликопина в предложенных хроматографических условиях на тот момент было практически невозможно. В дальнейшем при анализе растительных масел и установления фальсификации облепихового масла был применен обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ, изократический режим элюирования, что позволило провести разделение триглицеридов с рефрактометрическим детектором и каротиноидов со спектрофотометрическим детектором [171].

Наглядным примером преимущества метода ВЭЖХ в анализе сложных по составу объектов могут служить методики контроля качества БАД к пище, содержащих каротиноиды [172].

Следует отметить, что метод ВЭЖХ является приоритетным в анализе сложных объектов природного происхождения, а наличие СО каротиноидов позволит адекватно реализовать эти задачи. Безусловно, разделение суммы

каротиноидов на индивидуальные составляющие также может быть успешно проведено с использованием обращенно-фазового варианта ВЭЖХ и градиентного режима. Метод является фармакопейным, поэтому методики ВЭЖХ-анализа каротиноидов при определенных условиях могут быть включены в НД.

1.6 Микрокапсулирование в процессе создания лекарственных средств

Достижения в области медицинской химии, биотехнологии, химического синтеза и фармакологии позволяют создавать новые фармакологически активные вещества на основе пептидов и белков [173], однако они весьма чувствительны к воздействию внешних факторов и органических растворителей.

Вместе с этим в последнее время повысился интерес к отдельным классам БАВ природного происхождения, в частности к каротиноидам [15, 174-176], нафтохинонам [177], природным полиацетиленам [178] и другим соединениям, среди которых, как правило, большое число липофильных или малополярных структур. С одной стороны, особенности физико-химических свойств неполярных БАВ вызывает определенные технологические трудности при работе с ними [179]. С другой стороны, работа с гидрофильными веществами не позволяет проводить их адресную доставку к некоторым органам и тканям, например, осуществить прохождение гемато-энцефалического барьера и доставлять ЛС в ткани мозга [180].

Одной из задач фармацевтической технологии является разработка оптимальной ЛФ с учетом физико-химических особенностей фармацевтической субстанции и терапевтической направленности препарата, что успешно решается путем микрокапсулирования [181].

Микрокапсулирование ЛВ – это процесс заключения мельчайших частиц вещества в любом агрегатном состоянии в одну или несколько биосовместимых оболочек, в результате чего образуется стабильный продукт с измененными физико-химическими и биофармацевтическими свойствами – микрокапсулы.

Основные цели, которые достигаются путем микрокапсулирования, условно можно классифицировать следующим образом:

1. Улучшение товароведческих показателей фармацевтической субстанции:

- защита от воздействия внешних факторов (электромагнитного излучения, влажности и др.) – стабилизация;
- маскирование запаха, вкуса;
- уменьшение или устранение слеживаемости;
- увеличение срока годности.

2. Изменение физических характеристик ЛВ:

- предотвращение летучести;
- перевод жидких ЛВ в псевдотвердое состояние.

3. Улучшение физико-химических свойств ЛВ:

- изменение растворимости;
- введение несовместимых ЛВ в состав одной ЛФ.

4. Изменение биофармацевтических свойств ЛВ – получение ЛФ с:

- направленным эффектом;
- пролонгированным действием;
- модифицированным высвобождением;
- магнитными свойствами.

5. Изменение фармакодинамических показателей ЛВ:

- уменьшение раздражающего действия;
- снижение токсического действия;
- снижение разовой и/или суточной дозы [182, 183].

Классические методы микрокапсулирования описаны в работах [184-186]. Физические методы микрокапсулирования подразумевают нанесение оболочки с помощью механических приемов. В основе химических методов получения МК лежат процессы, приводящие к синтезу пленкообразователя на поверхности ядра. Самую обширную группу составляют физико-химические методы [181].

При выборе метода микрокапсулирования ЛВ следует учитывать конкретную задачу микрокапсулирования с точки зрения фармакодинамических

характеристик ЛФ, в которую будут помещены МК, физико-химических свойств инкапсулируемого компонента, размера будущих МК, актуальным является вопрос стоимости процесса.

В настоящее время проводятся исследования по получению микрокапсулированных форм различных объектов с целью их использования в медицине и фармации [187-190].

Прежде всего, это перевод лабильных белковых молекул, например гемоглобина и альбумина в МК [191, 192]. Описаны способы включения гемоглобина в МК, которые получали методами последовательной адсорбции полиэлектролитов на матрицу кальция карбоната и агрегатов белка, полученные в его изоэлектрической точке. Процент инкапсулирования гемоглобина составил 45,64 и 58,32 % соответственно [193].

МК можно рассматривать как системы адресной доставки микро- и нанокапсул с использованием углеводных биополимеров: пектинов [194], альгинатов [195, 196], хитозанов [197], фукоиданов [198], каррагинанов, хондроитина сульфата [199, 200]. В последнее время большее внимание стало уделяться именно природным полимерам, в связи с тем что они обладают биосовместимостью, биodeградируемостью, биодоступностью и низкой токсичностью [196, 197-199]. Такие биополимеры чаще всего применяются для микрокапсулирования и транспорта белковых соединений – инсулина, генов эритропоэтина и гепарина нуклеиновых кислот и полисахаридов через тканевые барьеры [201-203]. Микрокапсулирование генетического материала является перспективным, т.к. может быть использовано при создании ДНК-вакцин [204], клеток для трансплантации, в частности гепатоцитов и бета-клеток [202, 203], клеточных культур для тестирования противоопухолевых препаратов [205], а также создании пробиотиков [206].

Важным направлением использования МК является инкапсулирование бактериофагов, поскольку такой технологический прием повышает срок годности препарата и позволяет получить МК и затем ЛФ с термолабильным биологическим материалом [207].

Задачи, которые позволяет решить микрокапсулирование, способствовали эффективному использованию метода для улучшения биофармацевтических свойств фармацевтических субстанций синтетического происхождения: этакридина лактата [208], фурацилина, тетрациклина, дибазола, метронидазола [209-211], афобазола [212, 213], фексофенадина [214], фенбендазола [215], цефалоспоринов [216, 217], пирацетама, нитросорбита [218] и др.

Не следует недооценивать значение микрокапсулирования для ЛВ природного происхождения [219]. Микрокапсулы, содержащие смесь водорастворимых экстрактов подорожника и календулы, получены бислойной адсорбцией каррагината и модифицированного хитозана на микрочастицах кальция карбоната с последующим растворением ядра действием ЭДТА. К методам включения экстрактов в оболочку относятся адсорбция и соосаждение, причем второй метод повышает степень иммобилизации [220].

Описан способ микрокапсулирования экстракта черёмухи поздней методом диспергирования в системе жидкость-жидкость [221].

Интересным с технологической точки зрения представляется микрокапсулирование полифенольных соединений, в частности флавоноидов [222].

Решение проблемы воспитания здорового поколения и повышения качества жизни, должно осуществляться путем сохранения биологической активности пробиотиков, что связано с повышением их устойчивости к негативному воздействию среды ЖКТ, увеличению их метаболической активности. Оптимальной формой для этой группы веществ являются МК из олигосахаридов, которые одновременно служат питательной средой, способствуют получению стабильной суспензии бактерий и устойчивы к агрессивной среде ЖКТ [223].

МК широко используются в производстве пищевых продуктов и добавок [199, 224]. Современные продукты питания должны соответствовать возросшим требованиям безопасности и нутриентной ценности. Использование функциональных продуктов питания с МК, содержащими омега-3 жирные кислоты, является перспективным с позиций здорового питания, что, как

правило, повышает стрессо-устойчивость и восприимчивость организма к некоторым заболеваниям [225, 226]. Кроме того, в инкапсулированном виде в пищевой промышленности используются ароматизаторы, консерванты, разрыхлители, загустители и др. [227, 228].

Следует отметить, что такой прогрессивный технологический прием, как микрокапсулирование, пока не нашел должного применения в процессе получения субстанций каротиноидов и ЛФ на их основе, а лишь частично используется для обогащения β -каротином функциональных продуктов питания [229].

1.7 Функциональное моделирование производственно ориентированных систем

Как правило, понятие «система» рассматривают, как совокупность объектов и взаимосвязь между ними. Сложность эмпирического описания многих функциональных систем определяется тем, что невозможно практически предопределить все ее компоненты и их логическую связь. В связи с этим возникает необходимость моделирования системы, которое подразумевает точное ее описание, основанное на определенном упрощении широкого эмпирического опыта и обобщении теоретических данных. Такой результат достигается за счет того, что система имеет общую цель и точку зрения. Под целью, как правило, понимают набор вопросов, на которые модель должна дать ответы, а точкой зрения является позиция или принцип, с которых описывается система [233-235].

Если рассматривать процесс изучения группы БАВ, например каротиноидов, или ее конкретных соединений, а именно субстанций каротиноидов, а тем более процесс разработки, изучения и конструирования ЛС на базе этих соединений, то становится очевидным, что это классическая функциональная, производственно ориентированная система.

Системное проектирование, а именно технология структурного анализа и проектирования – SADT (Structured Analysis and Design Technique), позволяет

проводить моделирование сложных функциональных систем [230-232]. Результатом совершенствования этой технологии является методология IDEF0, основные положения которой закреплены в национальных стандартах многих стран, в том числе и в Российской Федерации [233].

Нотация IDEF0 представляет собой строгую систему условных диаграммных обозначений, позволяющую классифицировать и логически представлять взаимосвязь производственных функций, объединенных единой целью [234, 235].

Нотация IDEF0 – это функциональное моделирование, которое позволяет структурировать функции фактически любой системы, в том числе и производственной. Основным ее преимуществом является использование графического языка диаграмм, построенных и логически связанных в соответствии с правилами стандарта IDEF0 [233].

Наличие в РФ стандарта для нотации IDEF0 [233] позволит нам использовать этот графический язык для разработки совмещенной методологии изучения каротиноидов и создания лекарственных форм на их основе.

Необходимо отметить, что функциональное моделирование широко применяется в ходе разработки и оптимизации бизнес-процессов, например, для совершенствования информационных библиотечных систем [236], внедрения инноваций в управление [237], анализа деятельности компаний жилищно-коммунального хозяйства [238], разработки производственной стратегии [239].

Достаточное количество публикаций посвящено применению нотации IDEF0 в образовательной сфере, в частности, оптимизации функционирования учебных заведений и их подразделений [240-243].

Что касается медицинской отрасли, то применение технологий семейства SADT ограничено контролем качества оказания медицинских услуг для пациентов различного профиля, например, с язвенными гастродуоденальными кровотечениями [244], врожденной челюстно-лицевой патологией [245], патологией сердечно-сосудистой системы [246-248].

Кроме того, нотация IDEF0 была использована в процессе создания электронных медицинских услуг и оценки их качества в нескольких регионах РФ

[249, 250], при контроле за оказанием медицинской помощи по программе обязательного медицинского страхования, а также обеспечения населения качественными товарами медицинского назначения, в частности, стерильными инструментами [251].

В фармации как одной из отраслей отечественной промышленности IDEF0-технология применяется крайне редко.

Так, метода IDEF0 был применен для построения моделей, позволяющих оптимизировать бизнес-процесс аптечных организаций [252, 253, 254].

В результате анализа работы 62 медицинских кабинетов были выработаны технологии, позволяющие управлять процессами использования ЛС в медицинских кабинетах [255]. В [256] рассмотрен процесс реализации товара в аптечной организации с применением стандарта IDEF0, при этом сделан акцент на прогрессивную мотивацию сотрудников, в частности, ее финансовую составляющую.

В работе [257] на примере Свердловской области проведено планирование работ службы медицины катастроф в условиях чрезвычайной ситуации и показано участие в них фармацевтической службы.

Интересна работа [258] по созданию обучающего фильма, в котором фармакодинамика ЛС, блокирующих кальциевые каналы, представлена в концепции IDEF0.

Единственной работой, в которой функциональное моделирование в нотации IDEF0 применено непосредственно к технологии получения ЛС, является создание технологической схемы для экстемпоральной мягкой ЛФ [259]. Авторы публикации сделали вывод о рациональности применения метода IDEF0 в построении технологических схем для аптеки, выполняющей производственные функции.

Учитывая то, что исследование каротиноидов и получение ЛФ на их основе многофункционально и производственно ориентировано, мы считаем возможным применение системного проектирования, в частности нотации IDEF0 для разработки методологии этого процесса.

Правовая обоснованность использования этой технологии моделирования подтверждена действием рекомендаций по стандартизации Р. 50.1.028-2001 «Информационные технологии поддержки жизненного цикла продукции. Методология функционального моделирования», утвержденных Госстандартом РФ в 2001 г. [233].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

Анализ данных литературы свидетельствует о том, что каротиноиды являются неотъемлемым компонентом для нормального функционирования организма и ответственны за многие биологические эффекты, некоторые из которых мало изучены. Это объясняется, прежде всего, тем, что для изучения взаимосвязи их структуры с биологической активностью, как правило, используется сумма каротиноидов с преобладанием одного из них, а не индивидуальные соединения этого класса. Кроме того, объективно А-провитаминную активность нельзя признать как основную групповую специфическую активность всего класса каротиноидов, так как она присуща только β -каротину, α -каротину и β -криптоксантину.

В настоящее время сформировалась приемлемая экспериментальная база для дальнейшего развития исследований в области технологии получения каротиноидов в виде моносоединений.

Кроме того, появилась перспектива положительных результатов в контексте получения стабильных субстанций каротиноидов. В публикациях отсутствуют какие-либо сведения по использованию МК с каротиноидами для медицинских целей, несмотря на то что это один из оптимальных способов стабилизации липофильных, термолабильных и светочувствительных соединений.

Резюмируя, можно констатировать, что на современном этапе развития фармацевтического анализа для изучения каротиноидов применяется весь арсенал современных физико-химических методов анализа. Однако не существует единой, обоснованной и унифицированной концепции аналитического изучения такого распространенного класса БАВ, как каротиноиды с учетом комплексного взаимного использования физико-химических методов, а также их поэтапного применения при изучении, получении, стабилизации и получении ЛФ на основе каротиноидов. Проведение исследований в этом направлении является принципиально важным и актуальным, т.к. позволит в короткий срок разработать

стратегию и дизайн аналитического сопровождения исследования представителей класса каротиноидов и ЛС на основе этих соединений.

Накопленный опыт применения в практической и экспериментальной медицине ЛС и БАД с четырьмя основными каротиноидами: β -каротина и ликопина – представителей подгруппы каротинов, лютеина и астаксантина – ксантофиллов позволяет провести теоретическое обоснование совмещенной методологии исследования, технологии получения каротиноидов, их ЛФ и аналитического сопровождения этих процессов, используя субстанции β -каротина, ликопина и лютеина, получаемых из растительных источников, и астаксантина, выделяемого из животного сырья.

К сожалению, в настоящий момент отсутствует единая методология получения индивидуальных каротиноидов из объектов различной природы, поэтому совершенствование технологических и аналитических подходов по созданию ЛС на основе каротиноидов актуально и требует дальнейшего изучения и развития.

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.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ. В Российской Федерации зарегистрировано лишь три номенклатурные позиции ЛС, для которых каротиноиды позиционируются как основная группа действующих веществ: «Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения», «Аекол, раствор для местного и наружного применения» и «Стрикс[®], таблетки, покрытые пленочной оболочкой» [260].

Основное направление применения каротиноидов – это их использование в качестве активных компонентов БАД или в виде пищевых красителей [261].

В связи с этим следует отметить неоправданно узкую направленность использования этого класса БАВ в народно-хозяйственных и, в частности медицинских и фармацевтических целях.

Основой разрабатываемого научного направления, характеризующегося медицинской и социальной значимостью, является создание унифицированного подхода к изучению этого класса БАВ, получению индивидуальных каротиноидов и конструированию ЛС на их основе.

Максимальное практическое медицинское применение ЛФ, содержащих каротиноиды, возможно только при наличии научнообоснованной методологии получения субстанций каротиноидов и создания ЛС на их основе.

Полученные в процессе решения этой проблемы результаты позволят реализовывать данное научное направление с качественно новых позиций.

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты, оборудование, реактивы и материалы

Объекты исследования:

- субстанции каротиноидов β -каротин, ликопин, лютеин, астаксантин, выделенные по унифицированной методике (Глава 3);
- данные государственного реестра лекарственных средств в режиме он-лайн;
- данные государственного реестра БАД в режиме он-лайн.

В качестве источников каротиноидов были использованы

- лекарственное растительное сырье:
 - листья крапивы, производитель ЗАО Фирма «Здоровье», серия 081214;
 - листья крапивы, производитель ООО ПКФ «Фитофарм», серия 040914;
 - листья крапивы, собранные в окрестностях г. Пятигорска в июне 2014 г., присвоен номер серии 11.06.14;
- другие источники каротиноидов:
 - мякоть плодов тыквы, сорт Крошка, выращенных в 2014 г. из семян группы компаний «Гавриш», качество плодов соответствовало ГОСТ 7975-2013 «Тыква продовольственная свежая. Технические условия»;
 - томаты сорта Загадка, выращенные в 2014 г из семян группы компаний «Гавриш», качество томатов соответствовало ГОСТ 1725-85 «Томаты свежие. Технические условия»;
 - корнеплоды моркови, сорт Шантанэ, выращенные из семян группы компаний «Гавриш», качество корнеплодов соответствовало ГОСТу 32284-2013 «Морковь столовая свежая, реализуемая в розничной торговой сети. Технические условия»;
 - продукт переработки томатов – томатная паста «Помидорка», ООО «Югоптторг-23», Россия, г. Краснодар, произведенная в соответствии с ГОСТ Р 54678-2011;

- креветки атлантические «NORTON» глубокой заморозки (район лова – Северная Атлантика), производить ООО «Проморе», Россия, г. Москва, изготовленные по ТУ 9265-001-83239589-11;

➤ лекарственные средства:

- облепиховое масло образец №1 – облепиховое масло, полученное первичной экстракцией метиленхлоридом 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;
- микрокапсулы с β -каротином, полученные в лаборатории Пятигорского медико-фармацевтического института, лабораторные серии К01, К02, К03;
- микрокапсулы с ликопином, полученные в лаборатории Пятигорского медико-фармацевтического института, лабораторные серии ЛИ01, ЛИ02, ЛИ03;
- микрокапсулы с лютеином, полученные в лаборатории Пятигорского медико-фармацевтического института, лабораторные серии ЛЮ01, ЛЮ02, ЛЮ03;
- микрокапсулы с астаксантином, полученные в лаборатории Пятигорского медико-фармацевтического института, лабораторные серии А01, А02, А03;
- капсулы желатиновые с микрокапсулами β -каротина, полученные в лаборатории Пятигорского медико-фармацевтического института, лабораторные серии Кк01, Кк02, Кк03;

- капсулы желатиновые с микрокапсулами ликопина, полученные в лаборатории Пятигорского медико-фармацевтического института, лабораторные серии ЛИк01, ЛИк02, ЛИк03;
- капсулы желатиновые с микрокапсулами лютеина, полученные в лаборатории Пятигорского медико-фармацевтического института, лабораторные серии ЛЮк01, ЛЮк02, ЛЮк03;
- капсулы желатиновые с микрокапсулами астаксантина, полученные в лаборатории Пятигорского медико-фармацевтического института, лабораторные серии Ак01, Ак02, Ак03;

➤ стандартные образцы:

- стандартный образец (СО) астаксантина (A3236 Sigma);
 - стандартный образец (СО) β-каротина (22040 Sigma);
 - стандартный образец (СО) ликопина (L9879 Sigma);
 - стандартный образец (СО) лютеина (127-40-2 Sigma-Aldrich);
- растворители и реактивы, используемые в исследовании,

соответствовали требованиям НД:

- хлороформ (ч.д.а.) ТУ 2631-020-11291058-96;
- ацетон (ч.д.а.) ГОСТ 2603-79;
- метанол (ч.д.а.) ГОСТ 6995-77;
- *n*-гексан (ч.д.а.) ТУ 2631-003-05807999-98;
- петролейный эфир ГОСТ 11992 - 66;
- диэтиловый эфир (ч.д.а) ТУ 2600-001-43852015-10 с изм. №1;
- спирт этиловый 95 %, 96 % ФС 2.1.0036.15;
- спирт этиловый 40 %, 70 % ФС 42-3071-00;
- спирт изобутиловый ГОСТ 5208-2013;
- глицерин марки ПК-94 ГОСТ 6824-96;
- диметилсульфоксид ТУ 6-09-3818-89;
- ацетонитрил для хроматографии ТУ 2636-040-44493179-00 с изм. №1;
- кислота ортофосфорная ТУ 2142-002-00209450-96;

- аммония ацетат ФС 1.3.0001.15;
 - вода очищенная ФС ФС.2.2.0020.15;
 - натрия гидроксид (ч.д.а.) ГОСТ 4328-77;
 - натрия гидрокарбонат ФС.2.2.0011.15;
 - алюминия оксид для хроматографии ТУ 6-68-164-99;
 - натрия сульфат ГОСТ 4166-76;
 - калия сульфат ГОСТ 4145-74;
 - аммония сульфат ГОСТ 9097-82;
 - натрия хлорид ФС.2.2.0014.15;
 - калия хлорид ФС.2.2.0009.15;
 - аммония хлорид ГОСТ 3773-72;
 - натрия ацетата 3-водный ГОСТ 199-78;
 - калия ацетат ГОСТ 5820-78;
 - аммония ацетата ГОСТ 3117-78;
 - кальция хлорид ФС 42-2567-00;
- оборудование, материалы:
- лабораторные сита С30/50 ГОСТ 3826-82;
 - весы лабораторные электронные ЛВ 210-А;
 - весы лабораторных ВЛ-210 Класс точности 1 (специальный);
 - блендер лабораторный Waring 8010S;
 - эксикатор по ГОСТ 25336-82;
 - перколятор лабораторный;
 - испаритель ротационный R-213b;
 - баня комбинированная лабораторная БКЛ-М;
 - перемешивающее устройство ЛАБ-ПУ-0;
 - спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ «Спектр», спектральный диапазон от 200 до 750 нм);
 - спектрофотометр СФ-56 (ОКБ «Спектр», спектральный диапазон от 200 до 750 нм);
 - спектрометр Bruker Avance III 400MHz;
 - масс-спектрометр Agilent 6420;

- хроматограф Agilent HPLC 1100;
- хроматограф Waters 481с диодно-матричным детектором PDP 990;
- газовый хроматограф Agilent 6890, headspace sampler Agilent G1888/7697;
- воронки делительные вместимостью 25, 100 и 500 мл;
- колбы конические вместимостью 25, 50, 100, 250 мл;
- колбы мерные вместимостью 25, 50, 100, 250, 25, 50 мл;
- цилиндры мерные градуированные на 10, 50, 100 и 500 мл;
- пипетки градуированные (класс точности 1) ГОСТ 29227–91;
- пластинки хроматографические «Sorbfil» типа ПТСХ-АФ-А-УФ и ПТСХ-П-А-УФ ТУ 4215-002-43636866-2007;
- желатин медицинский марки МК по ГОСТ 23058-89 «Желатин – сырье для медицинской промышленности. Технические условия»;
- оксид титана (IV) (диоксид титана, E171) ГОСТ 9808-84 «Двуокись титана пигментная. Технические условия с Изм. № 1, 2»
- масло подсолнечное ГОСТ 1129-2013;
- масло оливковое ГОСТ 5477-2015;
- масло вазелиновое медицинское ГОСТ 3164-78;
- программное обеспечение:
- Microsoft Office Word 2007;
- Microsoft Office Excel 2007.

2.2 Методы исследования

В соответствии с требованиями, описанными в ГФ XIII [117], были проведены следующие испытания:

- определение внешнего вида ЛРС;
- определение влажности исходного сырья;
- определение золы общей;
- определение золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте;
- определение однородности массы твердых дозированных ЛФ;
- определение распадаемости;

- определение однородности дозирования;
- регистрация ЯМР-спектров;
- регистрация ИК-спектров;
- регистрация электронных спектров;
- масс-спектрометрия;
- ТСХ;
- ВЭЖХ;
- ГЖХ.

В эксперименте также были использованы следующие методы:

- жидкостная экстракция, в частности метод ремацерации;
- микрокапсулирование:

- методом экструзии [181, 183, 195]: готовили суспензии навесок ликопина, β -каротина, астаксантина, лютеина в минимальном количестве воды 2,5 – 5 мл. Отдельно получали раствор желатина с концентрациями 20, 30, 40, 50 %. Суспензии активных ингредиентов смешивали с раствором полимера, диспергировали с добавлением минимального количества эмульгатора Твин-80, формирование микрокапсул проводили, продавливая смесь полимера и активного компонента через пипетку в 0,2 М раствор кальция хлорида или в воду с температурой +5-6 °С;

- методом коацервации [181, 183]: активные ингредиенты микрокапсул – субстанции β -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина вводили в раствор полимера по типу суспензии. Соотношение действующее вещество:полимер – 1:1. В качестве солей-осадителей (дегидратирующих агентов) были использованы растворы сульфата натрия, сульфата калия, сульфата аммония, ацетата натрия, ацетата калия, ацетата аммония, хлорида натрия, хлорида калия, хлорида аммония. Концентрации растворов солей – 5 %, 10 %, 20 %. Соотношение полимер:соль-осадитель – 2:1, 1:1, 1:2. Промывку микрокапсул во всех случаях проводили изобутиловым спиртом;

- получение микрокапсул диспергированием в несмешивающейся жидкости проводили в соответствии традиционной методикой, описанной в

работах [181, 213, 221]. Для производства микрокапсул использовали реактор УПМ-2 (ЗМА «Дружба», г. Враца) из нержавеющей стали, снабженный мешалкой якорного и паровой рубашкой. В масло вводили раствор желатина с распределенным в нем каротиноидом и перемешивают 10 мин. Диспергирование проводили до образования мягких микрокапсул, затем резко снижали температуру до 15 °С, подавая в рубашку реактора холодную воду. После получения микрокапсул их выгружали в сборник, отделяли от масла декантацией, промывали изобутиловым спиртом и сушили при комнатной температуре около 8 ч.

Расчет содержания каротиноидов и хлорофиллов при совместном присутствии проводили согласно методикам и формулам, опубликованным в работах [262-264]:

а) суммарное содержание каротиноидов в присутствии хлорофиллов в мг:

$$C_{x+c} = \frac{(4,785 \cdot A_{470} + 3,657 \cdot A_{664} - 12,76 \cdot A_{649}) \cdot 8,1}{a_x} \quad (2.1)$$

б) суммарное содержание хлорофиллов:

$$C_{a+b} = \frac{(5,24 \cdot A_{664} + 22,24 \cdot A_{649}) \cdot 8,1}{a_x} \quad (2.2)$$

в) содержание каротиноидов в сырье в пересчете на стандартный образец лютеина в процентах:

$$X = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 100 \cdot a_{ст} \cdot 1 \cdot 5 \cdot 100}{a_x \cdot 5 \cdot A_{ст} \cdot 100 \cdot 100 \cdot 50} \cdot \frac{100}{(100 - W)} \quad (2.3)$$

г) суммарное содержание хлорофиллов в процентах:

$$X_{\text{хлорофиллы}} = \frac{A_x \cdot 50 \cdot 100}{a_x \cdot 5 \cdot 944,5} \cdot \frac{100}{(100 - W)} \quad (2.4)$$

➤ функциональное моделирование и основные правила работы в нотации IDEF0:

IDEF0 модель представляет собой взаимосвязанные диаграммы, объединенные логическими ссылками друг на друга. Структура модели представлена блоками, которые отражают функции системы, и дугами, являющимися интерфейсами. Название блока (имя блока) должно быть в форме активного глагола или глагольного оборота [231-234].

Основная функция моделируемой системы показывается в виде блока на контекстной диаграмме (Рисунок 2.1).

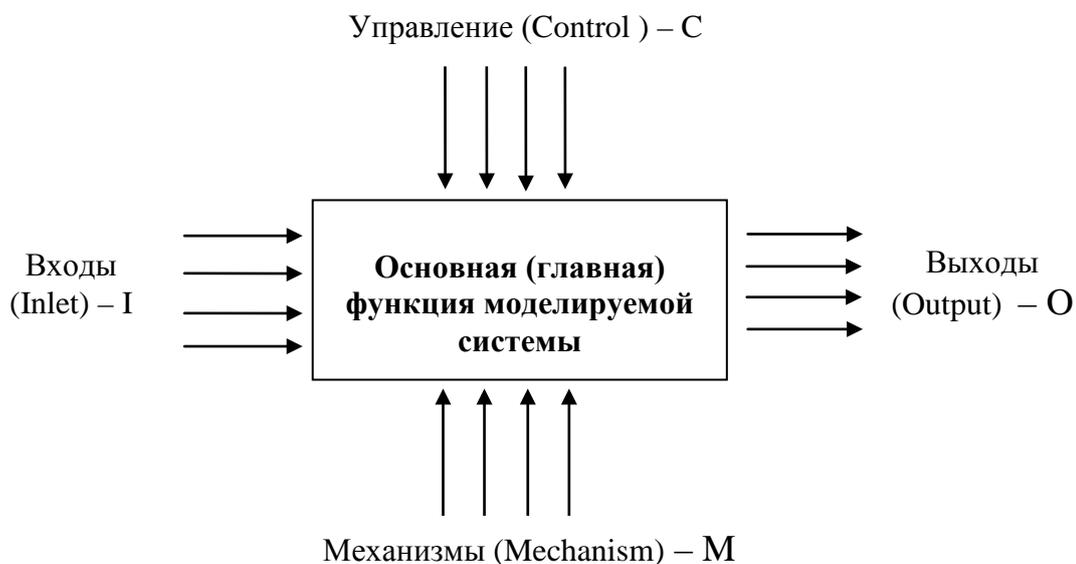


Рисунок 2.1 – Пример структуры контекстной диаграммы

Любая система (в нашем случае исследовательский и производственный процессы) подчиняется некоему управлению, например, нормативно-правовому. Все компоненты, оказывающие управляющее действие на систему, входят в диаграмму сверху, под ними обычно подразумевают управление (Control) (Рисунок 2.1).

Полный набор объектов – материальных (исходное сырье, растворители и т.д.) или информационных и др., которые подвергаются обработке в результате функционирования модели, отображаются слева от блока контекстной диаграммы и являются входами (Inlet) (Рисунок 2.1).

Механизмы (Mechanism), позволяющие функционировать системе, располагаются внизу диаграммы. Автором диаграммы механизмы могут быть представлены как любые материально-технические объекты и работа специалистов различного профиля, обеспечивающие функционирование системы, т.е. достижение генеральной идеи модели (Рисунок 2.1).

Продукты функционирования системы – выходы (Output) всегда показываются справа от основного блока модели. В понимании исследователя – это практическая значимость исследовательской работы (интеллектуальный

продукт, материально-техническая разработка и т.д.). Для работника производства продуктом системы является конечный материальный объект, ради создания которого функционирует предприятие (Рисунок 2.1).

Создание модели IDEF0 осуществляется посредством детализации контекстной диаграммы и далее диаграмм декомпозиции, при этом глубина и уровень детализации определяются исследователем самостоятельно [231-234].

Строгое выполнение правил построения диаграммной модели IDEF0 с применением правил стандарта IDEF0 позволяет проводить их однозначную трактовку, связывать диаграммы в единое целое в виде иерархии и обеспечивает адекватность функционирования построенной модели [231-234].

2.3 Методики исследования и условия проведения испытаний

Регистрацию ЯМР- спектров проводили на спектрометре Bruker Avance III 400MHz, используя одномерный вариант ^1H -ЯМР, со следующими параметрами: задержка – 2 с, время обнаружения – 4,56 с, ширина импульса – $5\mu\text{s}$ (угол поворота – 30°), количество сканирований – 64, спектральная ширина – 3,35кГц, растворитель – дейтерохлороформ (CDCl_3); концентрация испытуемого раствора 5 мг/0,5 мл.

Анализ методом ВЭЖХ проводили по разработанной следующей методике.

Подвижная фаза А. Метанол для хроматографии.

Подвижная фаза Б. Трет-бутилметилловый эфир для хроматографии.

Подвижная фаза В. Вода для хроматографии.

Испытуемый раствор. 0,01 г исследуемого вещества точная навеска помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и растворяли в подвижной фазе Б, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали, фильтровали полученный раствор через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Около 0,01 г (точная навеска) СО ликопина, β -каротина, лютеина помещали в мерную

колбу вместимостью 10 мл и растворяли в подвижной фазе Б, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали.

Хроматографирование выполняли на хроматографе Waters 481 с диодно-матричным детектором PDP 990.

Хроматографические условия

Колонка	250 мм x 4,6 мм с силикагелем (С30), с размером частиц 5 мкм (Dionex Acclaim С30) или аналогичная;
Температура колонки	25 °С;
Скорость потока	0,5 мл/мин;
Детектор	Спектрофотометрический, 450 нм;
Объем пробы	20 мкл.

Линейный градиент фаза А 85 %; Б 12 %; В 3% → А 5 %, Б 92 %; В 3% за 45 мин;

Установление структуры выделенных каротиноидов методом масс-спектрометрии проводили на масс-спектрометре Agilent 6420, сопряженном с ВЭЖХ системой Agilent HPLC 1100, методом химической ионизации при атмосферном давлении (APCI). Сканируемый диапазон масс (m/z) составлял 10 до 600 с разрешением 20 000.

Параметры ВЭЖХ:

- ✓ колонка Dionex Acclaim С30 (250x4,6 мм, 5 μм);
- ✓ температура колонки 25 °С;
- ✓ подвижная фаза метанол (фаза А), трет-бутилметилловый эфир (фаза Б), вода (фаза В);
- ✓ линейный градиент фаза А 85 %; Б 12 %; В 3% → А 5 %, Б 92 %; В 3% за 45 мин;
- ✓ объем пробы 20 мкл;
- ✓ скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;
- ✓ объем пробы автоматически вводимой в масс-детектор 20 мкл.

Параметры масс-спектрометра:

- ✓ капиллярное напряжение: 4 кВ (положительный), 2,8 кВ (отрицательный);
- ✓ температура ионного источника – 120 °С;
- ✓ температура десольватации – 300 °С;
- ✓ температура газа – 87 °С;
- ✓ скорость газа-носителя (гелий) 5 л/мин;
- ✓ температура газа для десольватации – 256 °С;
- ✓ энергии CID: 40 эВ.

Анализ полученных субстанций каротиноидов на содержание остаточных органических растворителей методом ГЖХ проводили в следующих разработанных условиях.

Стандартный раствор. 62,5 мкл этанола, 63,3 мкл ацетона, 0,4 мкл хлороформа и 4,4 мкл гексана помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешивали, 1 мл полученного раствора помещали в виалу (концентрация в полученном растворе этанола 0,5 мг/мл, ацетона 0,5 мг/мл, хлороформа 0,006 мг/мл, гексана 0,029 мг/мл).

Раствор для определения чувствительности. 1 мл стандартного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешивали.

Испытуемый раствор. 0,1 г (точная навеска) субстанции помещали в виалу, прибавляли 1 мл диметилсульфоксида и перемешивали.

Хроматографические условия:

Оборудование: газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором и парофазным дозатором проб;

Колонка: кварцевая капиллярная, 30 м x 0,53 мм, покрытая слоем полицианпропилдиметилсилоксаном толщиной 3 мкм (DB-624 или аналогичная);

Газ-носитель: гелий;

Скорость потока газа-

носителя:	35 см/сек;
Деление потока	1:5;
Температура инжектора:	200 °С;
Температура детектора:	250 °С;
Температуру колонки	программировали следующим образом: устанавливали начальную температуру 50 °С, выдерживали 5 мин, затем повышали ее до 240 °С со скоростью 20 °С/мин;
Объем пробы:	1,0 мл равновесной газовой фазы;
Время введение пробы	1 мин;
Температура пробоотборной петли	100 °С;
Температура виалы	80 °С;
Время цикла хроматографирования	30 мин.

Расчет содержания остаточного органического растворителя в субстанции в процентах (X) проводили по формуле:

$$X = \frac{S_x \cdot C_o \cdot 100}{S_o \cdot a}, \quad (2.5)$$

где S_x – площадь пика органического растворителя на хроматограмме испытуемого раствора;

S_o – площадь пика органического растворителя на хроматограмме стандартного раствора;

C_o – концентрация органического растворителя в стандартном растворе (мг/мл);

a – навеска субстанции, в мг.

Для анализа каротиноидов *методом ТСХ* предложены следующие условия проведения эксперимента:

- составы подвижных фаз:

н-гексан – ацетон (6:2) – ПФ I;

петролейный эфир – диэтиловый эфир – кислота уксусная (85:15:1) – ПФ II;

диэтиловый эфир – петролейный эфир (3:1) – ПФ III;

петролейный эфир – н-гексан (10:1) – ПФ IV [95, 140-142];

- испытуемые растворы – растворы полученных субстанций каротиноидов с концентрацией около $2 \cdot 10^{-6}$ г/мл ($2 \cdot 10^{-4}$ %);
- растворы СО β -каротина, ликопина, лютеина, астаксантина с концентрацией $2 \cdot 10^{-6}$ г/мл ($2 \cdot 10^{-4}$ %);
- для проверки хроматографических систем использовали растворы СО каротиноидов с концентрацией $2 \cdot 10^{-6}$ г/мл ($2 \cdot 10^{-4}$ %);
- хроматографирование проводили восходящим способом, хроматографическую камеру предохраняли от воздействия света, оборачивая ее алюминиевой фольгой;
- детекцию зон адсорбции проводят визуально по их окраске, после чего пластинки опрыскивают 10 % раствором фосфорномолибденой кислоты с последующим нагреванием до 60 °С в течение 2 мин. Зоны адсорбции всех каротиноидов проявляются в виде в ярко синих зон на зелено-желтом фоне [132, 133, 143, 148].

Анализ каротиноидов в микрокапсулах и капсулах проводили по разработанной методике: навеску предварительно растертых микрокапсул около 0,2 г (точная навеска) или содержимое одной капсулы около 0,2 г (точная навеска), переносили в делительную воронку, добавляли 25 мл н-гексана, встряхивали в течение 5 мин, приливали 10 мл 10% раствора натрия гидрокарбоната и 75 мл н-гексана. Смесь экстрагировали в течение 30 мин, затем отделяли гексановый слой и фильтровали.

1 мл гексанового фильтрата переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора гексаном до метки, перемешивали.

Измеряли оптическую плотность полученного раствора при следующих аналитических длинах волн: β -каротин – 450 нм, ликопин – 470 нм, лютеин – 445 нм, астаксантин – 468 нм [55, 116, 265].

Параллельно измеряли оптическую плотность $2 \cdot 10^{-6}$ г/мл ($2 \cdot 10^{-4}$ %) раствора СО соответствующего каротиноида (β -каротина, ликопина, лютеина, астаксантина).

Расчет количественного содержания каротиноидов в микрокапсулах проводили по формуле:

$$X_{\%} = \frac{A_x \cdot N \cdot C \cdot G}{A_0 \cdot a_x}, \quad (2.6)$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;
 A_0 – оптическая плотность раствора СО каротиноида;
 a_x – навеска микрокапсул, г;
 N – коэффициент учитывающий разведения, 2500;
 C – концентрация стандартного раствора, %;
 G – содержание каротиноида в стандартном образце, %.

Расчет количественного содержания каротиноидов в капсуле проводили по формуле:

$$X_{\text{мг/капс.}} = \frac{A_x \cdot N \cdot C \cdot G \cdot P}{A_0 \cdot a_x \cdot 100}, \quad (2.7)$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;
 A_0 – оптическая плотность раствора СО каротиноида;
 a_x – навеска, г;
 N – коэффициент учитывающий разведения, 2500;
 C – концентрация стандартного раствора, мг/мл;
 G – содержание каротиноида в стандартном образце, %
 P – средняя масса содержимого капсулы, г.

При отсутствии СО каротиноидов для расчетов можно применить значения удельных показателей поглощения: β -каротин – 2592, ликопин – 3450, лютеин – 2240, астаксантин – 2100 [55, 116, 265], используя формулу:

$$X_{\%} = \frac{A_x \cdot N}{a_x \cdot A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot l} \quad (2.8)$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;
 a_x – навеска микрокапсул, г;
 N – коэффициент учитывающий разведения, 2500;
 $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения каротиноида;

l – толщина кюветы, см.

$$X_{\text{мг/капс.}} = \frac{A_x \cdot N \cdot P}{a_x \cdot A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot l \cdot 100} \quad (2.9)$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

a_x – навеска микрокапсул, г;

N – коэффициент учитывающий разведения, 2500;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения каротиноида;

l – толщина кюветы, см;

P – средняя масса содержимого капсулы, г.

Выделения фракции каротиноидов из облепихового масла осуществляли в соответствии с предложенной методикой: 5 г облепихового масла, полученного по обновленной технологии путем первичной экстракции метиленхлоридом плодов в условиях производства ЗАО «Вифитех», заливали 50 мл 5 % спиртовым раствором калия гидроксида и перемешивали в течение 15 минут при температуре 30 °С, затем прибавляли н-гексан в соотношении 1:10 и троекратно экстрагировали в течение 20 мин. Полученные извлечения объединяли и промывали последовательно водой, 4 % раствором натрия гидрокарбоната, насыщенным раствором натрия хлорида, спиртом 40 %, равными объемами в течение 5 мин, после чего упаривали в роторном испарителе до объема 5 мл.

Сгущенное извлечение пропускали через колонку, заполненную 2,5 г оксида алюминия III степени активности при комнатной температуре. В качестве подвижной фазы использовали н-гексан.

Каротиноиды облепихового масла анализировали методом ТСХ в предложенных условиях: навеску каждого образца облепихового масла (образцы №1 – №5) 0,100 г растворяли в 50 мл н-гексана или петролейного эфира в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем. В качестве растворов сравнения использовали 0,0002 % растворы СО β-каротина, ликопина, лютеина.

На хроматографическую пластинку 10x15 см «Sorbfil» наносили 5 мкл испытуемого раствора каждого образца облепихового масла. Параллельно на пластинку наносили 5 мкл 0,0002 % раствора СО β-каротина, ликопина, лютеина в

н-гексане или петролейном эфире и растворы для проверки пригодности хроматографической системы.

Образцы хроматографировали восходящим способом в соответствующей ПФ (см. выше, Глава 2). Хроматографическую камеру предохраняли от воздействия света, оборачивая ее алюминиевой фольгой. После продвижения подвижной фазы до края пластинки пластинку вынимали и сушили на воздухе.

Система считается пригодной, если на хроматограмме для проверки пригодности хроматографической системы наблюдаются зоны адсорбции на уровне пятен СО каротиноидов.

Идентификацию проводили, сравнивая хроматографическую подвижность каротиноидов и их СО.

Спектрофотометрическое определение каротиноидов образцов (1, 3, 4, 5) облепихового масла в н-гексане проводили по следующей разработанной методике.

Приготовление испытуемого раствора. Точную навеску 0,10000 г образца облепихового масла помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл н-гексана и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Регистрировали спектр поглощения в диапазоне длин волн от 200 до 700 нм в кювете с толщиной слоя – 10 мм, раствор сравнения – н-гексан.

Идентификацию образцов проводили по положению максимумов поглощения и профилю спектров поглощения: максимумы поглощения должны находиться при 450 ± 2 , 477 ± 2 нм, возможно наличие плеча при 425 нм.

Суммарное содержание каротиноидов в образцах в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a_x \cdot 1} = \frac{A_x \cdot N}{2592 \cdot a_x}, \quad (2.10)$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель светопоглощения β -каротина (2592);

a_x – навеска образца, взятая на анализ, г;

N – коэффициент, учитывающий разведения, $N=100$.

Кроме того, провели расчет суммарного содержания каротиноидов в образцах с применением СО β -каротина.

Приготовление раствора СО β -каротина. Точную навеску СО β -каротина, равную 0,10000 г, помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл н-гексана доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор А).

1 мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор Б).

5 мл раствора Б переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор В).

Для раствора В СО β -каротина измеряли оптическую плотность при длине волны 450 ± 2 нм, используя в качестве раствора сравнения н-гексан.

Суммарное содержание каротиноидов в образце в процентах (X) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot 100 \cdot 0,1 \cdot 1 \cdot 5 \cdot G}{a_x \cdot A_{cm} \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25} = \frac{A_x \cdot N \cdot G}{a_x \cdot A_{cm}}, \quad (2.11)$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_{cm} – оптическая плотность раствора СО β -каротина;

a_x – навеска образца, взятая на анализ, г;

N – коэффициент, учитывающий разведения – 0,0002;

G – содержание β -каротина в СО, %.

Спектрофотометрическое определение каротиноидов образцов (1, 3, 4, 5) облепихового масла в петролейном эфире проводили по следующей разработанной методике.

Приготовление испытуемого раствора. Точную навеску 0,10000 г образца облепихового масла помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл петролейного эфира и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Спектр испытуемого раствора регистрировали в диапазоне длин волн от 200 до 700 нм, раствором сравнения служил петролейный эфир.

Идентификацию проводили по положениям максимумов поглощения, которые должны находиться при 450 ± 2 , 477 ± 2 нм. Возможно наличие плеча при 425 нм.

Далее с использованием удельного показателя светопоглощения – 2400 для длины волны 450 нм, растворителя – петролейный эфир было рассчитано суммарное содержание каротиноидов в образцах в пересчете на β -каротин.

Параллельно проводили расчет суммарного содержания каротиноидов в образцах в пересчете на β -каротин, но с использованием величины удельного показателя поглощения – 2592.

Суммарное содержание каротиноидов в образцах в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a_x \cdot 1} = \frac{A_x \cdot N}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a_x}, \quad (2.12)$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель светопоглощения β -каротина (2400 и 2592);

a_x – навеска образца, взятая на анализ, г;

N – коэффициент, учитывающий разведения, $N=100$.

Кроме определения суммарного содержания каротиноидов с использованием удельных показателей поглощения, устанавливали суммарное содержание каротиноидов в образцах с применением СО β -каротина.

Приготовление раствора СО β -каротина. Точную навеску СО β -каротина, равную 0,10000 г, помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл петролейного эфира и доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор А).

1 мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор Б).

5 мл раствора Б переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор В).

Для раствора В СО β -каротина измеряли оптическую плотность при длине волны 450 ± 2 нм, используя в качестве раствора сравнения петролейный эфир.

Суммарное содержание каротиноидов в образце в процентах (X) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot 100 \cdot 0,1 \cdot 1 \cdot 5 \cdot G}{a_x \cdot A_{cm} \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25} = \frac{A_x \cdot N \cdot G}{a_x \cdot A_{cm}}, \quad (2.13)$$

где A_x – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_{cm} – оптическая плотность раствора СО β -каротина;

a_x – навеска образца, взятая на анализ, г;

N – коэффициент, учитывающий разведения – 0,0002;

G – содержание β -каротина в СО, %.

Разработанная методика дифференциального спектрофотометрического анализа образца №2 облепихового масла (для обоих растворителей).

Приготовление испытуемого раствора. Точную навеску 0,10000 г образца облепихового масла №2 помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл н-гексана или петролейного эфира и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Приготовление раствора сравнения. Точную навеску 0,10000 г растительного масла помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл н-гексана или петролейного эфира и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Для испытуемого раствора регистрировали спектр поглощения в диапазоне длин волн от 200 до 700 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, в качестве раствора сравнения использовали раствор растительного масла в н-гексане или петролейном эфире.

2.4 Дизайн и теоретическая модель исследования в нотации IDEF0

Построение общего дизайна исследования основывалось на соблюдении системного подхода, применении универсальных методов научного познания, а именно анализа, синтеза, обобщения, научной индукции, логической аналогии, функционального моделирования и др. Обобщенный дизайн исследования представлен на рисунке 2.2.



Рисунок 2.2 – Дизайн исследования

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.

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 получения ЛФ на основе индивидуальных каротиноидов и подтвердить или опровергнуть адекватность начальных теоретических предположений.

В соответствии с правилами моделирования IDEF0 [231-234] вся экспериментальная часть исследования представлена как контекстная диаграмма «Провести экспериментальное изучение каротиноидов» (Рисунок 2.3).

В качестве управлений нами выбраны нормативно правовые акты, действующие в фармацевтической отрасли на момент создания модели и контролирующие процессы изучения БАВ и разработку ЛФ на их основе.

Входами модели служат вспомогательные вещества, сырьевые источники, которые могут быть использованы для получения индивидуальных каротиноидов, и данные источников литературы и патентов. Очевидно, что критический анализ литературных данных позволяет сформулировать основные задачи и направления эксперимента и является начальной теоретической основой для его дальнейшего планирования.

Механизмы – это весь материальный и человеческий ресурс, обеспечивающий полноценный и достоверный эксперимент.

Как выходы мы обозначили те позиции, которые считаем максимально вероятным теоретическим и практическим результатом всего эксперимента.



Рисунок 2.3 – Контекстная диаграмма модели IDEF0 экспериментального модуля исследования

Обобщенность контекстной диаграммы предопределила ее детализацию. Кроме того, как показал анализ обзора литературы, достижение цели исследования не возможно без совместного решения и технологических, и аналитических задач. Комплексность эксперимента и стремление получить адекватный результат требуют четкой направленности этапов исследования и их взаимосвязи.

Общая идея эксперимента теоретически может быть фрагментирована следующим образом (Рисунок 2.4):

- обоснование и разработка технологии получения четырех субстанций каротиноидов-маркеров – блок А1 диаграммы декомпозиции;
- всестороннее современное аналитическое исследование полученных субстанций, включающее подтверждение их структуры, – блок А2 диаграммы декомпозиции;
- стабилизация субстанций каротиноидов и получение оптимальной ЛФ с каждым из четырех каротиноидов-маркеров – блок А3 диаграммы декомпозиции;
- применение разработанных аналитических приемов на уже зарегистрированном в РФ ЛС с каротиноидами – блок А4 диаграммы декомпозиции;
- окончательное структурирование результатов эксперимента и построение обобщенной IDEF0 модели создания ЛФ на основе каротиноидов – блок А5 диаграммы декомпозиции.

Следует отметить, что управлениями для всех блоков диаграммы рисунка 2.4 являются особенности физико-химических свойств каротиноидов – термо- и фотолабильность, высокая восстановительная емкость и способность к изомеризации под действием агрессивного механического воздействия. Проведение экспериментальной части исследования и получение репрезентативных данных невозможно без выполнения требований нормативных документов, которые также выделены нами в качестве управлений модели.

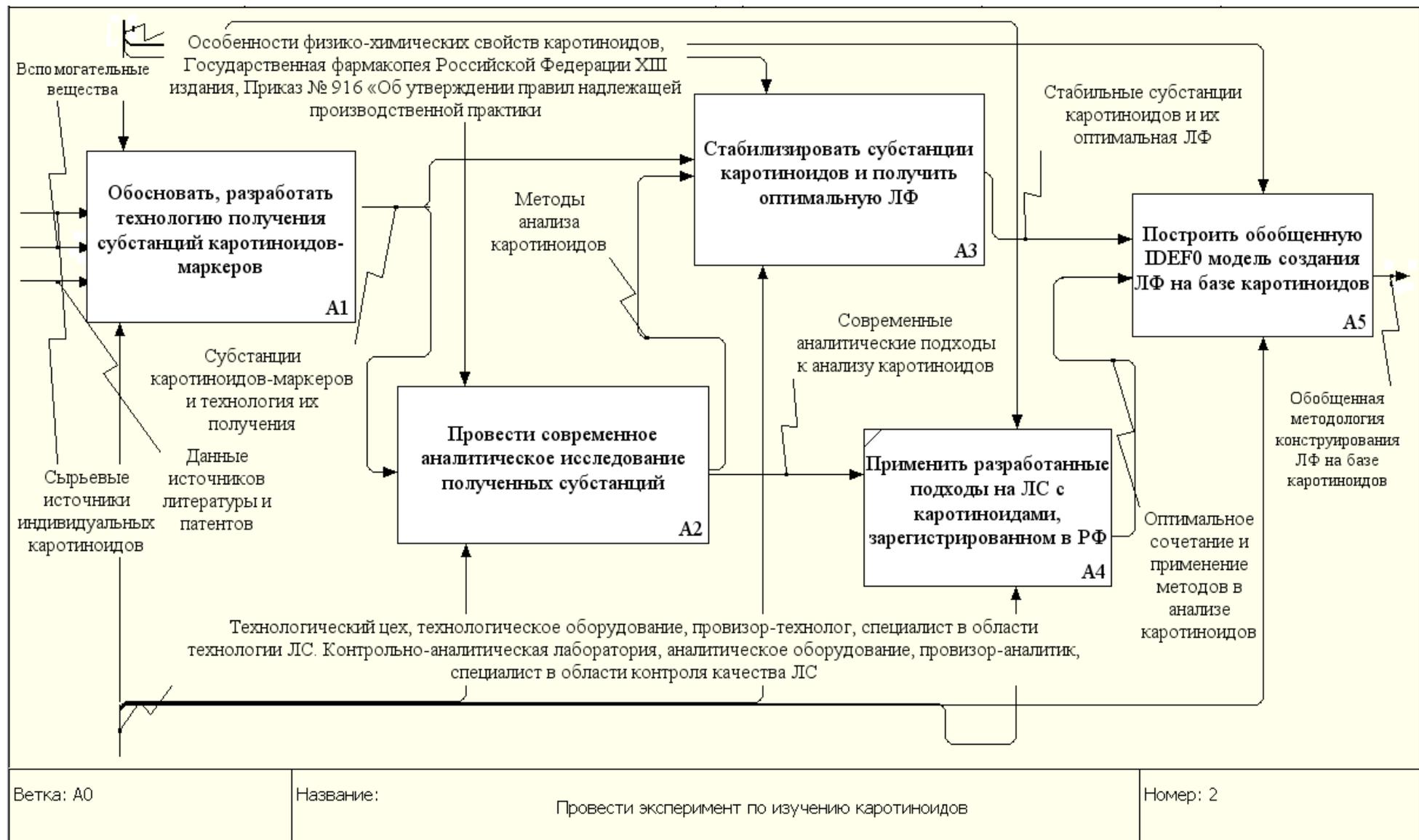


Рисунок 2.4 – Диаграмма декомпозиции

В качестве входов для блока А1 выбраны сырьевые источники индивидуальных каротиноидов, вспомогательные вещества и данные литературных источников, т.к. именно эти объекты подвергаются «переработке и трансформации» при реализации технологического эксперимента в рамках функции А1.

Логическую взаимосвязь практических этапов нашего исследования планируется осуществляться через интерфейсные дуги диаграммы, т.е. входы и выходы. Так, мы предполагаем, что при положительной реализации эксперимента в рамках блока А1 его выходом будут индивидуальные каротиноиды-маркеры и обоснованная(ные) технология(и) их получения.

Очевидно, что далее будет необходимо провести аналитическую часть эксперимента (блок А2, рисунок 2.4), т.е. доказать индивидуальность полученных субстанций, применяя современные аналитические методы. Кроме того, аналитический блок А2 подразумевает обоснование общих подходов к анализу каротиноидов. В связи с этим при экспериментальном подтверждении наших предположений выходом для этого блока диаграммы будут методы анализа каротиноидов и подходы к анализу каротиноидов, которые являются входами для блоков А3 и А4, соответственно. Это должно обеспечить логическую связь экспериментальных этапов исследования.

Следует принимать во внимание то, что ограниченное использование субстанций индивидуальных каротиноидов частично обусловлено их нестабильностью, поэтому для дальнейшей работы с этими соединениями следует технологически обосновать и подтвердить, что микрокапсулирование может служить методом стабилизации каротиноидов.

Основное направление использования микрокапсулированных каротиноидов – это получение оптимальной ЛФ. Данный этап отражен в функции блока А3 рисунка 2.4. При успешном проведении эксперимента в рамках блока А3 выходом будут стабильные субстанции каротиноидов и их оптимальные ЛФ. Выход блока А3 является входом для блока А5, т.к. и стабильная субстанция каротиноида, и его ЛФ, и методы их анализа – это объекты, которые будут

обрабатываться и осмысляться при посторении обобщенной методологии создания ЛФ на основе каротиноидов в нотации IDEF0.

Максимальное практическое значение планируемого исследования в ближайшее время может быть определено использованием полученных аналитических наработок в работе предприятий, производящих ЛС с каротиноидами на территории РФ. Кроме того, применение разработанных подходов (технологических и аналитических) на ЛС с каротиноидами, уже зарегистрированном в РФ, может или подтвердить, или опровергнуть теоретические предположения и показать возможность или невозможность «переноса» лабораторного эксперимента в условия предприятия. Этот фрагмент исследования зафиксирован блоком А4 рисунка 2.4. Выходом для блока А4 должно стать оптимальное сочетание и применение методов анализа каротиноидов. Безусловно, что этот результат должен быть учтен при посторении обобщенной методологии создания ЛФ на основе каротиноидов, поэтому выход блока А4 – это вход блока А5.

Завершающим этапом исследования должно стать построение обобщенной IDEF0 модели создания ЛФ с каротиноидами, т.к. именно ЛФ является объединяющим и логичным финалом исследования представителей любого класса БАВ, в том числе и каротиноидов. Как показал анализ литературных данных, функциональное моделирование в нотации IDEF0 является инструментом позволяющим структурировать, логически объединять теоретические и экспериментальные данные и проводить прогнозирование результатов исследования. Преимущество нотации IDEF0 перед другими моделями – действие стандарта, утвержденного на территории РФ [233].

Таким образом, дальнейшее проведение и изложение экспериментальной части диссертационного исследования проводилось в соответствии с IDEF0 моделью экспериментального модуля.

ГЛАВА 3 ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КАРОТИНОИДОВ

Современная экономическая ситуация, сложившаяся за последние 5 лет и обусловленная введением экономических санкций в отношении Российской Федерации, требует более интенсивного и эффективного решения вопросов в рамках ФЦП «Развитие медицинской и фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 и дальнейшую перспективу». Подходы, отражающие создание современных ЛС, утверждены Министерством образования и науки РФ и реализуются по следующим основным направлениям с использованием:

- методов биотехнологии и генной инженерии;
- соединений, синтезированных химическим путем;
- веществ природного происхождения;
- новых вакцин [10].

В фармацевтической отрасли при создании современных ЛС на основе природных соединений общим вектором является стремление к получению фармацевтического продукта, для которого фармакологическая активность была бы однозначно связана с конкретной группой БАВ или индивидуальным веществом. Решение этой задачи неразрывно связано с технологией получения индивидуальных субстанций БАВ и их анализом.

Изучение процессов экстракции, а также технологии получения галеновых суммарных фитопрепаратов и новогаленовых суммарных очищенных фитопрепаратов прямо или косвенно затрагивают вопросы получения суммы каротиноидов из различных природных объектов, что нашло отражение в публикациях [5-7]. Однако решение технологической задачи по получению индивидуальных соединений каротиноидов, остается актуальным, что подтверждается современными подходами к созданию передовых ЛС [8-10].

В соответствии с целью, задачами и дизайном исследования были осуществлены теоретическое обоснование и последующие создание и оптимизация технологии получения субстанций каротиноидов.

Данный этап эксперимента был проведен в соответствии с блоком А1 диаграммы декомпозиции дизайна исследования в нотации IDEF0 (Рисунки 2.3, 2.4, Глава 2).

В рамках этого фрагмента исследования был применен универсальный метод познания – научная индукция, которая основана на поиске и изучении причинных зависимостей и существенных признаков объектов, объединенных в один класс каротиноидов.

Применяя классические научные методы аналогии и моделирования и базируясь на результатах эксперимента, решение поставленной задачи мы осуществили на примере получения индивидуальных каротиноидов, в частности, β -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина.

Основной причиной выбора этих объектов в качестве модельных послужило то, что именно эти каротиноиды в разное время были зарегистрированы в России и входят в реестр ЛС РФ в настоящее время [260].

Таким образом, опыт использования β -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина в качестве ЛС, вспомогательных веществ и активных компонентов БАД в нашей стране создает определенную предпосылку для дальнейшего более широкого применения и изучения этих каротиноидов в фармацевтическом контексте.

Руководствуясь комплексным подходом к решению научной задачи, используя логический метод совместно с приемами критического и экономико-математического анализов, нами был выработан алгоритм действий, который позволил минимизировать интеллектуальные и материальные затраты при проведении исследований (Рисунок 3.1).



Рисунок 3.1 – Алгоритм разработки технологии получения субстанций каротиноидов

В соответствии с разработанным дизайном весь планируемый объем исследований можно разделить на следующие взаимосвязанные смысловые блоки:

- выбор перечня каротиноидов и их природных источников;
- выбор экстрагентов;
- обоснование метода и условий экстракции с учетом физико-химических особенностей изучаемой группы БАВ;
- проведение экспериментальных исследований;
- оптимизация процесса получения индивидуальных каротиноидов на базе экспериментальных данных;
- разработка аналитического сопровождения процесса получения каротиноидов.

Дальнейшая работа велась в соответствии с теоретически выработанными направлениями.

3.1 Выбор индивидуальных каротиноидов и сырьевых источников для их получения

Как показано в главе 1 в современной мировой экспериментальной и практической медицине используется около десяти каротиноидов, хотя выделено из природных источников и установлена структура и активность для более 800 представителей этого класса соединений [52-53].

Наибольшее внимание исследователи по-прежнему проявляют к β -каротину, ликопину, лютеину, астаксантину, поскольку они остаются наиболее востребованными представителями этой группы БАВ [15-17, 25]. Этот научный интерес находит отражение и в конъюнктуре российского фармацевтического рынка ЛС и БАД с каротиноидами. Как показали собственные исследования, максимальное число БАД, применяемых в Российской Федерации, содержат эти четыре объекта [78, 260, 266-268].

В связи с этим на первом этапе исследования необходимо было выбрать несколько основных индивидуальных соединений для дальнейшей работы и определить основные сырьевые источники их получения.

Для получения репрезентативных технологических и аналитических данных, которые в дальнейшем позволили бы провести экстраполяцию на весь класс соединений, следовало выбрать каротиноиды, относящиеся к разным подклассам. Еще одним критерием при выборе объектов исследования послужило распространение каротиноидов в растительном и животном мире.

Руководствуясь результатами изучения данных литературы, описанными в разделе 1.3, собственными фрагментарными исследованиями фармацевтического рынка ЛС и БАД в РФ [266-268], в качестве изучаемых мы выбрали индивидуальные каротиноиды-маркеры: β -каротин, ликопин (каротины), лютеин, астаксантин (ксантофиллы).

Опираясь на литературные данные, приведенные в разделе 1.3, для получения этих индивидуальных соединений мы выбрали следующие сырьевые источники: корнеплоды моркови и мякоть плодов тыквы (β -каротин); томаты и продукты переработки томатов (ликопин); панцири креветок (астаксантин); лист крапивы двудомной (лютеин).

Столь строгое ограничение объектов и источников их получения связано со стремлением получить адекватную технологическую модель и для каротинов, и для ксантофиллов, а «размывание» границ эксперимента и теоретических выкладок не позволит достигнуть поставленной цели.

3.2 Обоснование влажности, режима сушки, типа измельчения сырья и экстрагентов

Извлечение каротиноидов из растительных объектов по возможности следует проводить в кратчайшие сроки, поскольку при хранении в результате процессов окисления и ферментативного расщепления происходит изменение их структуры и, как следствие, активности. При отсутствии возможности быстрой

переработки и с целью уменьшения деструктивных процессов допускается заморозка сырья, что было учтено в эксперименте [265].

Поскольку каротиноиды являются термолабильными соединениями, то исключается возможность сушки исходного сырья при температуре 100-105 °С, как это принято для основного перечня природного сырья [117]. Более того, нагревание как сырья, содержащего каротиноиды, так и первичных экстрактов с этими БАВ приводит к разрушению фармакофора молекулы каротиноида, в частности, полиеновой цепи, и снижению фармакологической активности [61, 269].

Тем не менее сушка сырья позволяет концентрировать любые БАВ в исходном сырье, в том числе и каротиноиды, что, в свою очередь, положительно влияет на эффективность процесса экстракции [270-272]. Поэтому далее экспериментально был проведен выбор условий сушки сырья.

Оптимальным интервалом значения влажности сырья, для которого имеются литературные данные по содержанию каротиноидов, является 13 – 15 %, в частности, крапивы двудомной листья – не более 14 %, ноготков лекарственных цветки – не более 14 %, сушеницы топяной трава – не более 13 %, калины плоды – не более 15 %, шиповника плоды – не более 14 % и др. [117, 273].

Анализ данных ГФ XIII [117] свидетельствует, что ЛРС, содержащее другие группы БАВ, имеет следующий допустимый уровень влажности: для бадана толстолистного корневища – не более 14 %, валерианы лекарственной корневища с корнями – не более 15 %, жостера слабительного плоды – не более 14 %, тополя почки – не более 8 %, укропа пахучего плоды – не более 12 %, черники обыкновенной плоды – не более 14 %. Вместе с тем есть виды ЛРС, для которых показатель влажности имеет значения, превышающие 15 %, например: аронии черноплодной сухие плоды – не более 17 %, можжевельника обыкновенного плоды – не более 20 % [117].

На основании фармакопейных значений влажности для различных видов ЛРС от 8 до 20 % [117], в качестве опорных значений влажности сырьевых источников каротиноидов были выбраны следующие интервалы: около 10 %; от

10 % до 15 %; около 20 %. Экспериментально при температуре 40 °С без доступа света была проведена сушка всех видов сырья, использованных в исследовании (Таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Влажность сырья и длительность процесса сушки при 40 °С *

Вид сырья	W**	T**	W	T	W	T
Мякоть плодов тыквы	10,0	14-15	14,3	10-12	19,6	5-6
Корнеплоды моркови	9,5	14-15	15,0	10-12	19,2	5-6
Томаты	10,0	17-19	15,0	15-16	20,5	10-12
Продукты переработки томатов	10,0	10-12	14,7	8-9	20,2	7-8
Панцири креветок (замороженное сырье)	8,5	6-7	13,1	4-5	18,7	2-3
Лист крапивы (свежее сырье)	8,0	10-12	12,3	8-9	18,0	5-6

* – в таблице представлены средние данные из шести параллельных определений;

** W – влажность сырья, %; T – время сушки, сут.

Очевидно, что подготовка исходного сырья с необходимым значением влажности, при более низких температурах приводит к увеличению продолжительности технологического процесса.

Данные, представленные в таблице 3.1, подтверждают, что на получение сырья с влажностью от 10 % до 15 % необходимо затратить от 4 до 19 суток в зависимости от вида используемого сырья. Однако этот прием, по нашему мнению, является оправданным, т.к. агрессивная сушка является причиной деструкции каротиноидов, что может объяснять их заниженное содержание в экстракте.

На рисунке 3.2 представлены спектры поглощения первичных гексановых экстрактов корнеплодов моркови (гидромодуль 1:10, число ступеней экстракции – 1, время контакта фаз – 20 мин), полученных из сырья, высушенного при нескольких температурных режимах, без доступа света.

Из представленных данных следует, что в результате агрессивной сушки полного разрушения β -каротина не произошло. Однако в результате интенсификации процесса окисления этих БАВ при повышении температуры в процессе сушки количественное содержание каротиноидов в экстракте снизилось.

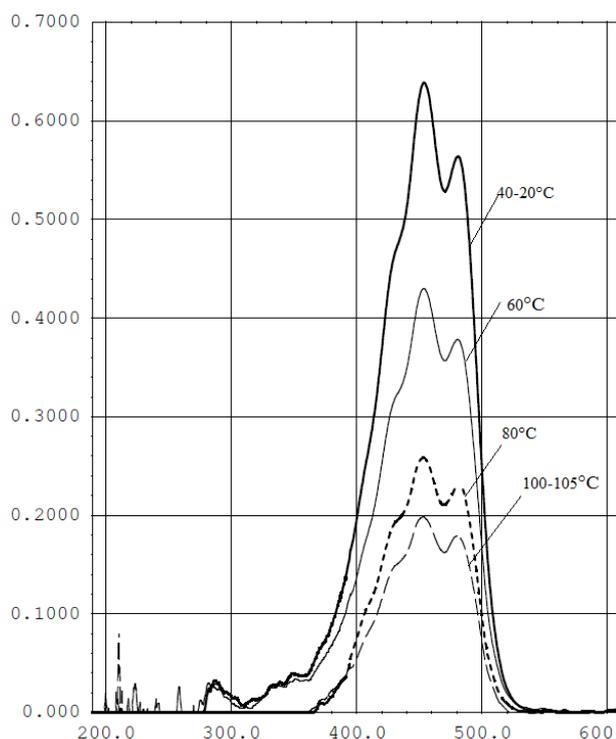


Рисунок 3.2 – Спектры поглощения экстрактов, полученных из корнеплодов моркови, высушенных при различных условиях

Таким образом, сушка при высокой температуре в дальнейшем приведет к снижению выхода конечного продукта, о чем свидетельствует снижение значения оптической плотности полученных экстрактов почти втрое. Кроме того, агрессивная сушка исходного сырья будет причиной дальнейшего снижения эффективности экстракции на этапе подготовительных мероприятий (стадии ВР), т.к. значительная часть каротиноидов окисляется, а это заведомо ведет к неэффективности технологической модели. В частности, неоправданная агрессивная сушка может быть причиной нерационального использования сырья, а именно, увеличения общей исходной массы сырья для получения экстракта с аналогичным уровнем содержания БАВ.

Учитывая физико-химические особенности каротиноидов, а также результаты предварительных испытаний по выбору условий экстракции, мы предложили следующий режим сушки всех видов исходного сырья: температура – 40 °С, без доступа света, до остаточной влажности не более 15 %.

Все сырье, использованное в дальнейших исследованиях, подвергали сушке в соответствии с выбранными условиями (Таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Определение влажности исходного сырья

Вид сырья	Влажность	Метрологические характеристики
Мякоть плодов тыквы	14,76	$S\bar{x} = 0,2954$ $\Delta X = 0,0759$ $\varepsilon\% = 0,51$
Корнеплоды моркови	14,95	$S\bar{x} = 0,0442$ $\Delta X = 0,1136$ $\varepsilon\% = 0,76$
Томаты	14,98	$S\bar{x} = 0,0330$ $\Delta X = 0,0848$ $\varepsilon\% = 0,57$
Продукты переработки томатов	12,010	$S\bar{x} = 0,0187$ $\Delta X = 0,0481$ $\varepsilon\% = 0,40$
Панцири креветок (после разморозки)	11,441	$S\bar{x} = 0,0285$ $\Delta X = 0,0731$ $\varepsilon\% = 0,64$
Лист крапивы (свежее сырье)	12,54	$S\bar{x} = 0,03657$ $\Delta X = 0,09398$ $\varepsilon\% = 0,75\%$

Таким образом, в эксперименте было использовано сырье с влажностью, не превышающей 15 % [117]. Эти показатели по определению влажности учитывались во всех дальнейших расчетах.

Одним из факторов, оказывающих существенное влияние на эффективность экстракции, является степень измельчения сырья [270, 274-276]. Это объясняется тем, что практически все природные БАВ имеют различную локализацию в клетке и клеточных мембранах. Для многих видов сырья уже установлены размеры частиц, обуславливающих оптимальную экстракцию многих групп БАВ. Например, для листьев крапивы этот показатель составляет 0,25-0,5 мм [272, 277].

Однако известно, что одинаковые по размеру частицы сырья, но полученные разными способами измельчения, будут по-разному участвовать в процессе экстракции. Как показано в работах В.Д. Пономарева, Ю.Г. Пшукова и

др., сырье с более разрушенной клеточной структурой экстрагируется эффективнее и быстрее, чем резаное [270, 272].

Эксперимент по изучению влияния способа измельчения на степень экстракции каротиноидов гексаном из различных видов сырья был проведен в одинаковых условиях, где использованы кратность экстракции – 1, время контакта фаз – 20 мин, соотношение сырье-экстрагент – 1:10. В качестве способов измельчения были выбраны резка вдоль волокон, резка поперек волокон и комплексное измельчение в лабораторном блендере до размера частиц не более 0,5 мм. Результаты представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Содержание каротиноидов в экстракте в зависимости от способа измельчения сырья

Наименование сырья	Продольная резка сырья	Поперечная резка сырья	Комбинированное измельчение
	содержание каротиноидов в экстракте, %		
Корнеплоды моркови	0,0544	0,0576	0,0784
Мякоть тыквы	0,0095	0,0010	0,0143
Плоды томата	0,0221	0,0230	0,0320
Панцири креветок	0,0051	0,0055	0,0077
Листья крапивы	0,0082	0,0090	0,0119

Установлено, что выход каротиноидов после продольной и поперечной резки находился в пределах 34% и 36% соответственно. После комплексного измельчения этот показатель в среднем составил около 50% от теоретически возможного.

Поскольку результаты эксперимента подтвердили, что комбинированное измельчение сырья позволяет получить первичный экстракт с большим содержанием каротиноидов, то в дальнейшем все сырье, использованное в эксперименте, подвергалось комплексному измельчению до размера частиц не более 0,5 мм.

Так как растворители, традиционно используемые для экстракции каротиноидов, извлекают, как правило, всю фракцию липофильных соединений,

то минимизировать их число можно, проводя частичное омыление некоторых групп БАВ.

Предварительно очистку от сопутствующих липофильных соединений осуществляли обработкой 50 % раствором калия гидроксида в соотношении 1:10 [278]. На основании данных литературы и проведенных дополнительных исследований установлено, что процесс омыления эффективнее проводить в более мягких условиях, поэтому в качестве омыляющего агента нами был предложен 4 % раствор натрия гидрокарбоната в течение 15 мин [279, 280].

Среди задач, связанных с подготовительными работами перед проведением экстракции, является выбор экстрагента. Предварительные исследования проводили, используя «универсальный» для всех каротиноидов растворитель – н-гексан. Однако последующие работы по получению индивидуальных каротиноидов требовали уточнения природы растворителя.

Объекты исследования, в частности β -каротин и ликопин, относятся к подклассу каротинов, а лютеин и астаксантин – ксантофиллов [52]. Каротины менее полярны, чем ксантофиллы, тем не менее все представители каротиноидов являются липофильными соединениями. Именно структура представителей этого класса определяет выбор растворителей, которые наиболее часто используют для их получения [53, 55].

При выборе экстрагента мы руководствовались данными по составу доминирующих каротиноидов в сырье и тем, какой индивидуальный каротиноид необходимо получить. Например, если сырье содержит преимущественно каротины, то для их получения использовали малополярный петролейный эфир. Для сырья, в котором доминирующими являются ксантофиллы, – более полярный спирт этиловый 95 % [78, 102, 103]. Кроме того, в работе использовали растворители, позволяющие экстрагировать и каротины, и ксантофиллы – хлороформ и ацетон. Следует отметить, что н-гексан и петролейный эфир являются низкополярными универсальными растворителями для всех подклассов каротиноидов [55].

Учитывая данные литературы [265, 281] и результаты собственных исследований [279, 282] мы выбрали такие растворители, как петролейный эфир, н-гексан, хлороформ, ацетон, спирт этиловый 95 %.

При выборе способа экстрагирования мы опирались на данные, опубликованные в открытой печати и патентах [281], а также руководствовались следующими положениями:

- минимальное «разрушающее» влияние процесса экстракции на структуру каротиноидов;
- возможность истощения сырья;
- простота и доступность аппаратного оснащения процесса;
- перспектива промышленной реализации технологической модели на предприятиях со средней и малой промышленной мощностью, а именно фармацевтических фабриках;

Заданным критериям отвечает статический, периодический многоступенчатый способ экстрагирования – метод ремацерации – дробной мацерации, которая предусматривает многократное настаивание, основанное на разнице концентраций БАВ на границе раздела фаз, что достигается периодическим обновлением экстрагента.

Таким образом, выбраны оптимальные условия подготовки исходного сырья для дальнейшего экстрагирования каротиноидов из различных объектов: влажность сырья не должна превышать 15 %, режим сушки – не более 40 °С без доступа света, тип измельчения – комплексный, растворители для проведения экстракции – петролейный эфир, н-гексан, хлороформ, ацетон, спирт этиловый 95 %, омыляющий агент – 4 % раствор натрия гидрокарбоната, метод экстракции – ремацерация.

3.3 Предварительный выбор условий экстрагирования каротиноидов

Следующим этапом наших исследований был выбор условий экстрагирования.

Известно, что повышение температуры приводит к интенсификации процесса экстракции [270, 242], однако каротиноиды являются термолабильными соединениями и под действием температуры способны к структурным изменениям [265]. С учетом этих особенностей при разработке технологии получения индивидуальных каротиноидов нами в качестве рабочей была выбрана температура 20 °С.

Решающим фактором, который определяет эффективность процесса экстракции, наряду с размером частиц сырья, является гидромодуль, причем соотношение массы растворителя и сырья должно обеспечивать максимальный переход БАВ в экстрагент, что определяется градиентом концентрации БАВ. Одновременно с этим объем растворителя должен быть оптимален, т.к. последующее концентрирование конечного продукта в условиях неоправданно большого объема растворителя повышает затратность технологии.

Оптимальное соотношение массы экстрагента к массе сырья определяли экспериментально. Были изучены следующие значения соотношения сырья и экстрагента: 1:5, 1:10, 1:15; 1:20 (Рисунок 3.3).

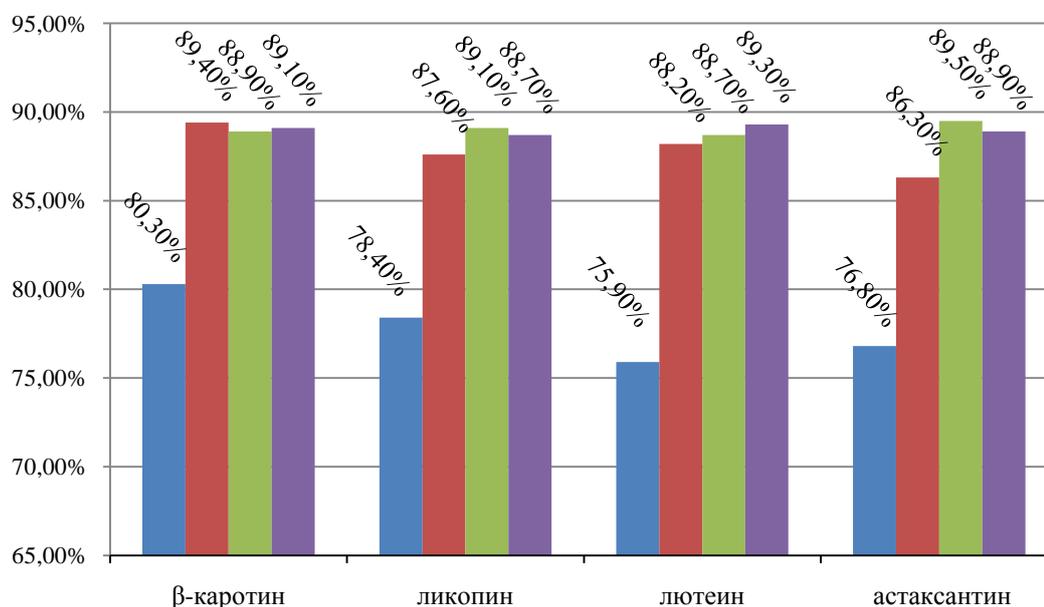


Рисунок 3.3 – Динамика экстрагирования каротиноидов при различной величине гидромодуля:

■ 1:5, ■ 1:10, ■ 1:15, ■ 1:20

Необходимо отметить, что при экстрагировании сырья в соотношениях 1:15 и 1:20 экстракты имеют меньшее значение оптической плотности, поскольку растворы разбавленные. Одновременно другим существенным недостатком этих соотношений является неоправданно большой объем растворителей при крупно-тоннажном производстве.

При сравнении полученных экспериментальных данных становится очевидным, что гидромодуль 1:5 обеспечивает выход экстракта до 80 %, а гидромодуль 1:10 позволяет осуществлять экстракцию каротиноидов примерно на уровне около 88 %. При соотношениях сырье:экстрагент 1:15 и 1:20 наблюдается максимальная эффективность, которая составляет примерно 89 %. Дальнейшее увеличение объема растворителя не приводит к повышению выхода продукта.

Принимая во внимание достаточность градиента концентрации БАВ, а также то, что неоправданное увеличение объема экстрагента приведет к затратам при концентрировании конечного экстракта, мы отдали предпочтение соотношению сырья и экстрагента – 1:10.

Одним из важных факторов технологической модели является кратность экстракции. Выбор числа ступеней экстракции показан на примере экстракции астаксантина из панцирей креветок. В качестве экстрагентов последовательно были использованы ацетон, хлороформ, спирт этиловый 95 %. Контроль над полнотой выделения астаксантина осуществляли спектрофотометрически путем непосредственного измерения оптической плотности полученных порций экстракта (раствор сравнения – экстрагент).

Процесс экстракции прекращали, если оптическая плотность не изменялась для двух последних экстрактов. Спектры поглощения и величины оптических плотностей при длине волны 481 нм для пяти ступеней экстракции на примере извлечений ацетоном, спиртом этиловым 95 % и хлороформом представлены на рисунках 3.4 – 3.6.

Установлено, что при добавлении четвертой и пятой порций ацетона оптическая плотность полученного экстракта оставалась неизменной и

находилась около 0,002, т.е. последующее добавление порции экстрагента было неэффективным (Рисунок 3.4).

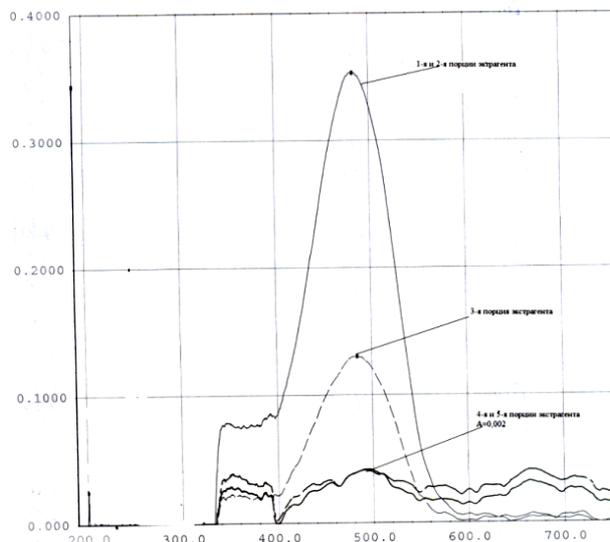


Рисунок 3.4 – Спектры поглощения экстрактов из панцирей креветок (экстрагент – ацетон)

Нами экспериментально доказано, что при добавлении пятой порции спирта этилового 95 % оптическая плотность полученного экстракта находилась в пределах 0,04, сырье практически обесцветилось, т.е. последующее добавление новой порции экстрагента не целесообразно (Рисунок 3.5).

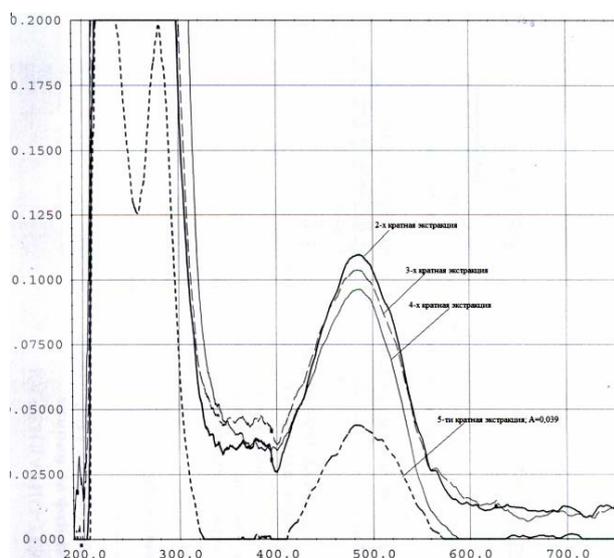


Рисунок 3.5 – Спектры поглощения экстрактов из панцирей креветок (экстрагент – спирт этиловый 95 %)

Аналогичная картина наблюдалась при использовании хлороформа: при добавлении четвертой и пятой порций хлороформа оптическая плотность экстракта практически не изменялась и находилась в пределах 0,02, при этом сырье практически обесцветилось, т.е. последующего добавления порции экстрагента не требуется (Рисунок 3.6).

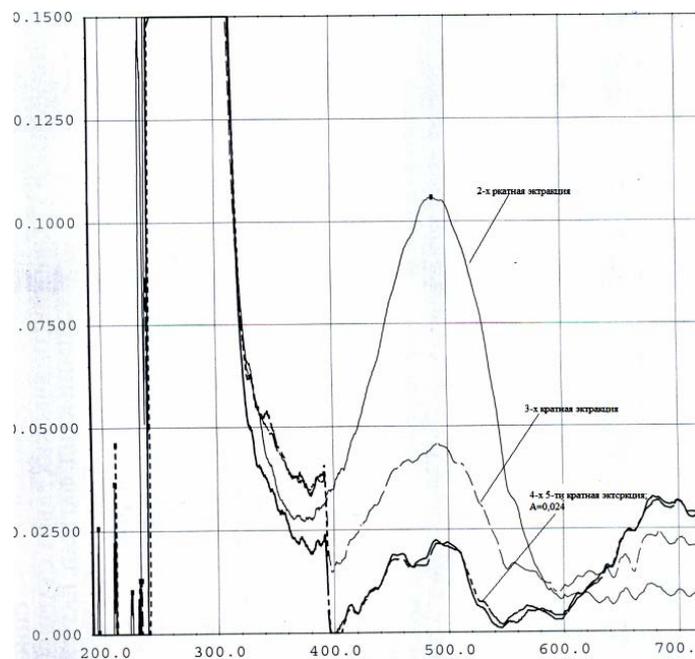


Рисунок 3.6– Спектры поглощения экстрактов из панцирей креветок (экстрагент – хлороформ)

Подобные эксперименты были проведены для β -каротина, ликопина и лютеина, что позволило установить опорное число ступеней экстракции равное 3. Одновременно с кратностью экстракции было определено базовое значение времени контакта фаз, которое составило 20 мин.

3.4 Обобщенный способ получения каротиноидов

Все виды исходного сырья предварительно сушат в сушильном шкафу при температуре 40 °С до содержания влаги не более 15 % без доступа света, предохраняя нативные каротиноиды от деструкции.

Подготовленное в указанных условиях 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.

Экстракты на основе органических растворителей объединяют и сушат до полного удаления растворителя. Полученные образцы хранят в запаянных ампулах оранжевого стекла, защищая от действия света.

Далее полученный 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 желтых, оранжевых, розовых, розово-оранжевых и красных 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 требует 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 для обработки первичного экстракта и количество алюминия оксида, помещаемое в колонку для хроматографического разделения каротиноидов.

Индивидуальная и перекрестная оптимизация опытным путем каждого из этих условий требовала бы расходования большой массы исходного сырья, экстрагентов, расходных материалов, а кроме того, заняла бы неоправданно большой промежуток времени. В связи с этим были использованы математические методы оптимизации с последующей экспериментальной апробацией расчетных результатов.

3.5 Оптимизация процесса получения индивидуальных каротиноидов методом математического планирования эксперимента

Комплексную оценку влияния технологических параметров на выход индивидуальных каротиноидов осуществляли методом математического планирования эксперимента, используя построение математической модели на основе уравнения регрессии первого порядка [283]. Как один из этапов способа получения каротиноидов в эксперименте был использован периодический трехступенчатый метод ремацерации и следующие условия экстрагирования: экстрагент – н-гексан, комбинированное измельчение сырья, величина гидромодуля – 1:10, время контакта фаз 20 мин. Предварительно температурный фактор был оставлен в классическом варианте – 20 °С, что продиктовано термолабильностью каротиноидов [284].

Для построения математической модели в качестве переменных величин были выбраны масса алюминия оксида, помещаемого в хроматографическую колонку, время контакта фаз на одной ступени экстракции, концентрация раствора натрия гидрокарбоната, число ступеней экстракции, температурный режим экстрагирования.

Для проверки значимости влияния этих факторов на процесс получения каротиноидов был сформирован эксперимент по типу дробной реплики, условия которого представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Условия планирования эксперимента

	Количество алюминия оксида X_1 , г	Время экстракции X_2 , мин	Концентрация раствора гидрокарбоната натрия X_3 , %	Число ступеней экстракций X_4 , раз	Температура X_5 , °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 2^3 был поставлен эксперимент в восьми повторностях в соответствии с матрицей планирования, представленной в таблицах 3.5 – 3.8.

Таблица 3.5 – План и результат эксперимента по получению β -каротина

№ опыта	Уровни факторов					Экспериментальное значение Y , %
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	
1	2	3	4	5	6	7
1	+	-	-	-	-	0,137
2	+	+	+	+	-	0,134
3	-	-	-	+	+	0,149
4	-	+	-	-	-	0,144
5	+	-	+	-	+	0,136
6	+	+	-	+	+	0,140
7	-	-	+	+	-	0,139
8	-	+	+	-	+	0,142

Продолжение таблицы 3.5

1	2	3	4	5	6	7
9	0	0	0	0	0	0,141
10	0	0	0	0	0	0,139
11	0	0	0	0	0	0,142
12	0	0	0	0	0	0,143
13	0	0	0	0	0	0,140
14	0	0	0	0	0	0,138

Таблица 3.6 – План и результат эксперимента по получению лютеина

№ опыта	Уровни факторов					Экспериментальное значение У, %
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	
1	2	3	4	5	6	7
1	+	-	-	-	-	0,0271
2	+	+	+	+	-	0,0266
3	-	-	-	+	+	0,0282
4	-	+	-	-	-	0,0277
5	+	-	+	-	+	0,0268
6	+	+	-	+	+	0,0276
7	-	-	+	+	-	0,0278
8	-	+	+	-	+	0,0279
9	0	0	0	0	0	0,0277
10	0	0	0	0	0	0,0274
11	0	0	0	0	0	0,0272
12	0	0	0	0	0	0,0275
13	0	0	0	0	0	0,0274
14	0	0	0	0	0	0,0273

Таблица 3.7 – План и результат эксперимента по получению ликопина

№ опыта	Уровни факторов					Экспериментальное значение Y, %
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	
1	2	3	4	5	6	7
1	+	–	–	–	–	0,098
2	+	+	+	+	–	0,093
3	–	–	–	+	+	0,111
4	–	+	–	–	–	0,103
5	+	–	+	–	+	0,097
6	+	+	–	+	+	0,099
7	–	–	+	+	–	0,096
8	–	+	+	–	+	0,097
9	0	0	0	0	0	0,099
10	0	0	0	0	0	0,098
11	0	0	0	0	0	0,102
12	0	0	0	0	0	0,101
13	0	0	0	0	0	0,097
14	0	0	0	0	0	0,099

Таблица 3.8 – План и результат эксперимента по получению астаксантина

№ опыта	Уровни факторов					Экспериментальное значение Y, %
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	
1	2	3	4	5	6	7
1	+	–	–	–	–	0,0115
2	+	+	+	+	–	0,0112
3	–	–	–	+	+	0,0128
4	–	+	–	–	–	0,0123
5	+	–	+	–	+	0,0114
6	+	+	–	+	+	0,0118
7	–	–	+	+	–	0,0119
8	–	+	+	–	+	0,0121

Продолжение таблицы 3.8

1	2	3	4	5	6	7
9	0	0	0	0	0	0,012
10	0	0	0	0	0	0,0119
11	0	0	0	0	0	0,0117
12	0	0	0	0	0	0,0121
13	0	0	0	0	0	0,0118
14	0	0	0	0	0	0,0118

Критерием оптимизации служило содержание, которое определяли спектрофотометрически как количество экстрагированного каротиноида в процентах.

На основании полученных результатов рассчитывали значения коэффициентов уравнения регрессии. Пример расчета и значения коэффициентов уравнения регрессии представлены в таблице 3.9.

Таблица 3.9 – Расчет значений коэффициентов уравнений регрессии

Пример расчета	Коэффициент в уравнении регрессии	Значение коэффициента
для β -каротина		
$b_0 = \frac{\sum y}{n} = \frac{1,121}{8} = 0,1401$ $b_1 = \frac{\sum y \cdot X_1}{n} = \frac{-0,027}{8} = -0,0034$	b_0	+0,1401
	b_1	-0,0034
	b_2	-0,0001
	b_3	-0,0024
	b_4	+0,0004
	b_5	+0,0016
для лютеина		
$b_0 = \frac{\sum y}{n} = \frac{0,2197}{8} = 0,0275$ $b_1 = \frac{\sum y \cdot X_1}{n} = \frac{-0,0035}{8} = -0,0004$	b_0	+0,0275
	b_1	-0,0004
	b_2	$-1,2 \cdot 10^{-5}$
	b_3	-0,0002
	b_4	$+8,8 \cdot 10^{-5}$
	b_5	+0,0002
для ликопина		
$b_0 = \frac{\sum y}{n} = \frac{0,794}{8} = 0,0993$ $b_1 = \frac{\sum y \cdot X_1}{n} = \frac{-0,02}{8} = -0,0025$	b_0	+0,0993
	b_1	-0,0025
	b_2	-0,0013
	b_3	-0,0035
	b_4	+0,0005
	b_5	+0,0018

для астаксантина		
$b_0 = \frac{\sum y}{n} = \frac{0,095}{8} = 0,0119$	b_0	0,0119
	b_1	-0,0004
$b_1 = \frac{\sum y \cdot X_1}{n} = \frac{-0,0032}{8} = -0,0004$	b_2	$-2,5 \cdot 10^{-5}$
	b_3	-0,0002
	b_4	$5,0 \cdot 10^{-5}$
	b_5	0,0001

Как показали расчеты, коэффициенты в уравнениях регрессии для первого, второго и третьего фактора имели отрицательные значения, для четвертого и пятого – положительные.

На основании полученных результатов были составлены опорные уравнения регрессии, имеющие следующий вид:

для β -каротина:

$$y=0,1401-0,0034x_1-0,0001x_2-0,0024x_3+0,0004x_4+0,0016x_5 \quad (3.1)$$

для лютеина:

$$y=0,0275-0,0004x_1-1,2 \cdot 10^{-5}x_2-0,0002x_3+8,8 \cdot 10^{-5}x_4+0,0002x_5 \quad (3.2)$$

для ликопина:

$$y=0,0993-0,0025x_1-0,0013x_2-0,0035x_3+0,0005x_4+0,0018x_5 \quad (3.3)$$

для астаксантина:

$$y=0,0119-0,0004x_1-2,5 \cdot 10^{-5}x_2-0,0002x_3+5,0 \cdot 10^{-5}x_4+0,0001x_5 \quad (3.4)$$

Далее согласно матрице эксперимента по результатам опытов в нулевых условиях, отраженных в таблицах 3.5 – 3.8, проводили оценку дисперсии коэффициентов уравнений:

$$y_0 = \frac{\sum y}{n} = \frac{0,843}{6} = 0,141 \quad (3.5)$$

$$S_y = \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n-1} = 8,4 \cdot 10^{-4} \quad (3.6)$$

$$S_y^2 = 7,1 \cdot 10^{-7} \quad (3.7)$$

$$S_{bi}^2 = \frac{S_y^2}{n} = \frac{7,1 \cdot 10^{-7}}{8} = 0,89 \cdot 10^{-7} \quad (3.8)$$

$$S_{bi} = 2,98 \cdot 10^{-4} \quad (3.9)$$

Для определения значимости коэффициентов уравнений регрессии рассчитывали величину критерия Стьюдента и сравнивали расчетное значение с табличным – 2,57 [117]:

$$t_0 = \frac{b_0}{S_{bi}} = \frac{0,1401}{2,98 \cdot 10^{-4}} = 470 \quad (3.10)$$

$$t_1 = 11,40; \quad t_2 = 0,44; \quad t_3 = 7,99; \quad t_4 = 1,25; \quad t_5 = 5,50$$

Таблица 3.10 Результаты определения значимости коэффициентов в уравнениях регрессии

Параметр	β-Каротин	Лютеин	Ликопин	Астаксантин
y_0	0,141	0,027	0,099	0,012
S_y	$8,4 \cdot 10^{-4}$	$1,72 \cdot 10^{-4}$	$1,86 \cdot 10^{-3}$	$1,47 \cdot 10^{-3}$
S_y^2	$7,1 \cdot 10^{-7}$	$2,97 \cdot 10^{-8}$	$3,47 \cdot 10^{-6}$	$2,17 \cdot 10^{-8}$
S_{bi}^2	$0,89 \cdot 10^{-7}$	$3,71 \cdot 10^{-9}$	$4,33 \cdot 10^{-7}$	$2,71 \cdot 10^{-9}$
S_{bi}	$2,98 \cdot 10^{-4}$	$6,09 \cdot 10^{-5}$	$6,58 \cdot 10^{-4}$	$5,20 \cdot 10^{-5}$
t_0	470	451	151	228
t_1	11,40	7,18	3,79	7,69
t_2	0,44	0,21	1,89	0,48
t_3	7,99	3,08	5,32	4,32
t_4	1,25	1,44	0,76	0,96
t_5	5,50	2,67	2,66	2,88

Коэффициенты Стьюдента для второго (t_2) и четверного факторов (t_4) меньше табличных, что свидетельствует о минимальном влиянии на выход каротиноидов времени контакта фаз более 10 мин и кратности экстракции – более 2 ступеней.

Наибольшее положительное влияние на процесс оказывает температура (t_5). Максимальное отрицательное влияние оказывает количество алюминия оксида (t_1), если происходит увеличение его массы более 5 г.

После учета влияния факторов на процесс получения β-каротина, лютеина, ликопина, астаксантина уравнения регрессии приняли окончательный вид:

для β -каротина:

$$y=0,1401-0,0034x_1-0,0024x_3+0,0016x_5 \quad (3.11)$$

для лютеина:

$$y=0,0275-0,0004x_1-0,0002x_3+0,0002x_5 \quad (3.12)$$

для ликопина:

$$y=0,0993-0,0025x_1-0,0035x_3+0,0018x_5 \quad (3.13)$$

для астаксантина:

$$y=0,0119-0,0004x_1-0,0002x_3+0,0001x_5 \quad (3.14)$$

Поскольку построенная математическая модель нуждается в проверке адекватности, то, используя окончательные уравнения регрессии (3.11 – 3.14) и матрицу эксперимента, представленную в таблицах 3.5 – 3.8, мы рассчитывали теоретические значения измеряемого показателя. Расчет содержания каротиноида и результаты на примере β -каротина представлены в таблице 3.11.

По полученным данным рассчитывали сумму квадратов отклонений экспериментальных данных от теоретических и дисперсию адекватности:

$$S_R = \sum(y_o - y_p)^2 = 0,000144^2 = 2,1 \cdot 10^{-8} \quad (3.15)$$

$$S_R^2 = \frac{S_R}{N-f} = \frac{2,1 \cdot 10^{-8}}{14-6} = 4,15 \cdot 10^{-9} \quad (3.16)$$

Таблица 3.11 – Значения экспериментального и рассчитанного содержания β -каротина по окончательному уравнению регрессии

№ опыта	Пример определения расчетного содержания ($y_{\text{расчетное}}$) каротиноида: $y_1=0,1401-0,0034(+1)-0,00238(-1)+0,00163(-1)=0,138$		
	$y_{\text{экспериментальное}}$	$y_{\text{расчетное}}$	$y_o - y_p$
1	2	3	4
1.	0,137	0,138	-0,001
2.	0,134	0,133	0,001
3.	0,149	0,148	0,001
4.	0,144	0,144	0
5.	0,136	0,136	0
6.	0,140	0,141	-0,001
7.	0,139	0,139	0
8.	0,142	0,143	0,001
9.	0,141	0,136	0,005

1	2	3	4
10.	0,139	0,136	0,003
11.	0,142	0,136	0,006
12.	0,143	0,136	0,007
13.	0,140	0,136	0,004
14.	0,138	0,136	0,002

Далее было рассчитано значение критерия Фишера:

$$F = \frac{S_R^2}{S_y^2} = \frac{4,15 \cdot 10^{-9}}{3,50 \cdot 10^{-6}} = 0,0012 \quad (3.17)$$

Расчетное значение критерия Фишера составило 0,0012, что не превышает табличное значение этого показателя – $F_{0,95}(8,13) = 2,77$ [117] и позволяет утверждать, что разработанная модель адекватна.

На следующем этапе проводили оптимизацию процесса получения каротиноида, параметр оптимизации – содержание каротиноида в процентах. Для этого использовали метод крутого восхождения, который представлен в таблице 3.12. 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 процесс получения каротиноида 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 3.12 – Крутое восхождение по содержанию каротиноида

Характеристика	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	y
1	2	3	4	5	6	7
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

Продолжение таблицы 3.12

1	2	3	4	5	6	7
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.

Полученные на основе построенной теоретической модели и оптимизации технологических параметров экспериментальные данные позволяют нам предложить унифицированную технологическую схему получения индивидуальных каротиноидов, представленную на рисунке 3.7.



Рисунок 3.7 – Унифицированная технологическая схема получения индивидуальных каротиноидов

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

Обобщая полученные теоретические и экспериментальные данные по разработке унифицированного способа получения каротиноидов, следует отметить, что специфической особенностью этого класса БАВ является их практически тотальное «соседство» с фотосинтетическими пигментами, в частности с хлорофиллами зеленых частей растений, а также их присутствие в гидробионтах в виде сложных эфиров жирных кислот, что характерно, например, для астаксантина. Помимо этого имеет место неминуемая одновременная экстракция каротиноидов и других липофильных соединений из объектов животного происхождения, что, несомненно, требовало проведения дальнейшей детализации технологии получения субстанций каротиноидов.

3.6 Частные способы получения каротиноидов

Поскольку до 99 % всех природных каротиноидов содержатся в зеленых частях растений [265], то очевидно, что работа с таким видом сырья требует учета совместного присутствия каротиноидов и хлорофиллов, что создает необходимость введения стадии их разделения. Технология получения астаксантина из гидробионтов также нуждается во введении дополнительных стадий, учитывающих особенности изолирования каротиноидов из животных объектов.

3.6.1 Разработка условий экстракции каротиноидов в присутствии хлорофиллов

В качестве модельного объекта исследования мы использовали фармакопейное ЛРС – крапивы двудомной листья (*Urticae dioicae folia*). Для выбора условий получения фракции, содержащей хлорофиллы и каротиноиды, были проанализированы литературные данные по способам получения извлечений из этого вида сырья.

Наиболее распространенным экстрагентом для получения суммы БАВ крапивы является спирт этиловый 70 %. Он позволяет извлекать комплекс БАВ, включающий суммы флавоноидов, гидроксикоричных кислот, каротиноидов и хлорофиллов. Экстракция осуществляется дробно в течение 30 мин на каждой стадии, гидромодуль – 1:100, температурный режим – 100 °С [73].

Описано получение ацетонового извлечения из крапивы двудомной листьев, согласно которому экстракция осуществлялась в течение 2 ч при нагревании на кипящей водяной бане (99-100 °С) с обратным холодильником и соотношении сырье:экстрагент – 1,5:100. Готовый продукт преимущественно содержит хлорофиллы и каротины [285, 286].

В работе [287] показана перспективность использования синтетических эфиров высших жирных кислот для экстракции листьев крапивы. Авторы

применили метод мацерации с настаиванием в течение 2 ч при температуре 75 °С. Очевидно, что липофильные экстрагенты позволили получить фракции, содержащие сумму хлорофиллов и каротиноидов.

Наиболее слабым местом для всех описанных в литературе способов получения каротиноидов из листьев крапивы является нагревание в ходе экстракции. Повышение температуры, как правило, ведет к интенсификации процесса экстракции, однако каротиноиды – термолабильные соединения, способные к изомеризации и деструктивным изменениям [288]. Повышение температуры при экстракции, возможно, приведет не только и к уменьшению концентрации этих БАВ в целевом продукте, но и к получению нестабильных результатов при аналитической оценке качественного состава извлечения. С учетом этого, получение экстракта нами планируется проводить при комнатной температуре.

Наиболее интересным с позиций получения индивидуальных веществ природного происхождения, по нашему мнению, представляется подход, предполагающий предварительную экстракционную очистку исходного сырья от сопутствующих групп БАВ [285]. Для получения более чистого извлечения, содержащего полисахариды, авторами предлагается предварительно обрабатывать воздушно-сухое сырье спиртом этиловым 80%, что, вероятно, позволит «избавиться» от присутствия в целевом продукте значительного числа спирторастворимых БАВ, в частности каротиноидов и хлорофиллов.

Одним из перспективных направлений при изучении растительного сырья является совершенствование подходов и выбор условий фракционирования по классам соединений, которые, как правило, сопутствуют друг другу. Данная проблема в контексте разделения каротиноидов и хлорофиллов изучена слабо и предусматривает изолирование этих соединений на стадии анализа, как правило, методом КХ или ТСХ [281]. В связи с этим достаточно интересным представляется решение задачи по разделению каротиноидов и хлорофиллов на этапе экстракции.

С учетом данных литературы и собственных предварительных исследований теоретически нами предложен алгоритм реализации исследования, который представлен на рисунке 3.8.



Рисунок 3.8 – Алгоритм разделения каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов

Такой подход при дальнейшем совершенствовании позволит одновременно получать две относительно очищенные фракции – хлорофиллов и каротиноидов. В литературе имеются сведения о возможности получения дифференцированных фракций этих классов БАВ, но только на уровне методической литературы [289, 290].

Экстрагентами, которыми экстрагируют оба класса БАВ, являются спирт этиловый 95 %, ацетон и хлороформ, поэтому получение суммарного модельного

экстракта, содержащего и каротиноиды, и хлорофиллы, мы проводили, используя именно эти растворители.

Базируясь на физико-химических свойствах каротиноидов и хлорофиллов, их растворимости в органических растворителях, а также технических возможностях и доступности метода, было решено осуществлять контроль за процессом экстракции методом спектрофотометрии [78, 262-264].

3.6.1.1 Установление товароведческих показателей исходного сырья

В исследовании использовалось фармакопейное ЛРС – крапивы двудомной листья (*Urticae dioicae folia*), поэтому предварительно были установлены параметры качества сырья и товароведческие показатели.

По внешнему виду все серии крапивы двудомной листьев, использованные в эксперименте, соответствовали требованиям ГФ XIII [117].

В связи с тем что значение показателя влажности оказывает существенное влияние на процесс экстракции БАВ и расчет количественного содержания, необходимо было установить величину этого критерия для всего исходного сырья.

Листья крапивы, собранные в окрестностях г. Пятигорска в июне 2015 г. сушили при 40 °С без доступа света.

Определение влажности для всех серий крапивы двудомной листьев, использованных в эксперименте, проводили методом высушивания согласно требованиям [117]. Результаты определения влажности представлены в таблице 3.13.

Таблица 3.13 – Влажность крапивы двудомной листьев

№ серии	Влажность, %	Метрологические характеристики
081214	12,54	$\bar{x} = 12,51$ $S\bar{x} = 0,02485$ $\Delta X = 0,06386$ $\varepsilon\% = 0,51\%$
	12,39	
	12,50	
	12,55	
	12,51	
	12,55	
040914	12,56	$\bar{x} = 12,53$ $S\bar{x} = 0,02175$ $\Delta X = 0,05590$ $\varepsilon\% = 0,45\%$
	12,48	
	12,55	
	12,47	
	12,51	
	12,61	
11.06.14	12,61	$\bar{x} = 12,54$ $S\bar{x} = 0,03657$ $\Delta X = 0,09398$ $\varepsilon\% = 0,75\%$
	12,41	
	12,58	
	12,46	
	12,52	
	12,64	

Как следует из данных таблицы 3.13, влажность для всех трех серий не превысила значения нормы – не более 13 %. Среднее значение влажности составило 12,53 %. Таким образом, по данному показателю сырье соответствовало требованиям ГФ XIII [117].

Содержание золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, характеризует содержание минеральных веществ и соединений кремния в сырье, соответственно, и представлено в таблице 3.14.

Таблица 3.14 – Зола общая и зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте

№ серии	Зола общая, %	Метрологические характеристики	Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	Метрологические характеристики
1	2	3	4	5
081214	15,59	$\bar{x} = 15,64$ $S\bar{x} = 0,02840$ $\Delta X = 0,07298$ $\varepsilon\% = 0,4\%$	1,41	$\bar{x} = 1,39$ $S\bar{x} = 0,0086$ $\Delta X = 0,0220$ $\varepsilon\% = 1,58\%$
	15,65		1,39	
	15,70		1,35	
	15,56		1,40	
	15,60		1,40	
	15,74		1,39	

Продолжение таблицы 3.14

1	2	3	4	5
040914	12,96	$\bar{x}=13,06$	1,54	$\bar{x}=1,53$
	13,05	$S\bar{x}=0,04657$	1,57	$S\bar{x}=0,01194$
	12,98	$\Delta X=0,1198$	1,55	$\Delta X=0,0307$
	13,24	$\varepsilon\%=0,92\%$	1,50	$\varepsilon\%=2,01\%$
	13,15		1,50	
	12,97		1,51	
11.06.14	16,96	$\bar{x}=17,00$	1,74	
	17,08	$S\bar{x}=0,0394$	1,72	$\bar{x}=1,74$
	16,87	$\Delta X=0,1013$	1,70	$S\bar{x}=0,0141$
	17,12	$\varepsilon\%=0,60\%$	1,77	$\Delta X=0,0362$
	16,93		1,70	$\varepsilon\%=2,09\%$
	17,05		1,78	

Среднее значение золы общей не превысило норму – не более 20 % – и составило от 13,06 до 17,00 %. Значение золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, также не выходило за пределы установленной ГФ XIII нормы – не более 2 % (от 1,39 % до 1,74 %) [117]. Таким образом, по результатам исследования все три серии исходного сырья соответствовали требованиям [117] и могли использоваться для дальнейших исследований.

Поскольку предполагалась последовательная экстракция крапивы двудомной листьев водой очищенной, спиртом этиловым 40 %, спиртом этиловым 70 %, спиртом этиловым 95%, то определение экстрактивных веществ проводили методом 3 в соответствии с ГФ XIII [117].

Данные по содержанию экстрактивных веществ в каждой фракции, полученной последовательной обработкой навески сырья различными экстрагентами, представлены в таблице 3.15.

Таблица 3.15 – Содержание экстрактивных веществ в крапивы двудомной листьях*

№ серии	Содержание экстрактивных веществ, %			
	\bar{x}	$S\bar{x}$	ΔX	$\varepsilon\%$
экстрагент – вода очищенная				
081214	40,54	0,05498	0,14131	0,35
040914	40,24	0,10440	0,26832	0,67
11.06.14	39,86	0,22062	0,56699	1,41
экстрагент – спирт этиловый 40 %				
081214	26,51	0,15162	0,38966	1,48
040914	26,86	0,07837	0,20141	0,75
11.06.14	27,16	0,02740	0,07042	0,26
экстрагент – спирт этиловый 70 %				
081214	14,87	0,02217	0,05697	0,38
040914	15,06	0,03741	0,09614	0,64
11.06.14	14,32	0,02455	0,06308	0,44
экстрагент – спирт этиловый 95%				
081214	16,31	0,01014	0,26050	0,16
040914	15,94	0,02444	0,06282	0,39
11.06.14	16,24	0,02871	0,07380	0,45

* – данные таблицы получены по результатам шести параллельных определений, обработаны статистически ($p=0,95$).

Максимальное количество экстрактивных веществ извлекается водой очищенной, а спирт этиловый 70 % и спирт этиловый 95 % экстрагируют примерно равные количества веществ из сырья.

Получение суммарного экстракта, содержащего каротиноиды и хлорофиллы, и разделения этих групп БАВ было бы невозможно без данных по содержанию изучаемых соединений в исходном сырье.

Количественное определение каротиноидов и хлорофиллов в листьях крапивы проводили спектрофотометрически, применяя методики и варианты

расчета содержания этих веществ при совместном присутствии согласно источникам [262-264].

В качестве экстрагентов использовали спирт этиловый 95 % и ацетон с содержанием воды 20 % (Таблица 3.16).

Таблица 3.16 – Содержание каротиноидов и хлорофиллов в исходном сырье*

Номер серии	Содержание суммы каротиноидов, %			
	\bar{x}	$S\bar{x}$	ΔX	$\varepsilon\%$
081214	0,03459	0,00024	0,00061	1,78
040914	0,03523	0,00033	0,00084	2,38
11.06.14	0,03481	0,00037	0,00095	2,74
	Содержание суммы хлорофиллов, %			
	\bar{x}	$S\bar{x}$	ΔX	$\varepsilon\%$
081214	0,36012	0,000423	0,001088	2,99
040914	0,36861	0,000426	0,001094	3,00
11.06.14	0,35007	0,000478	0,001228	3,40

* – данные таблицы получены по результатам шести параллельных определений, обработаны статистически ($p=0,95$).

Среднее значение содержания суммы каротиноидов в листьях крапивы составляет около 0,035 %, хлорофиллов – 0,360 %, что согласуется с данными литературы [66-68, 275].

3.6.1.2 Получение экстракта из крапивы двудомной листьев, содержащего суммарную фракцию каротиноидов и хлорофиллов

Для получения конечного экстракта с минимальным содержанием сопутствующих веществ нами были изучены условия разделения каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов, для чего исходное сырье предлагается последовательно обрабатывать растворителями в порядке уменьшения их полярности. Кроме того, дополнительная предварительная обработка исходного сырья раствором натрия гидрокарбоната 4 % позволит уже на этом этапе

осуществить лучшее связывание жирных кислот и снизит их содержание в конечном экстракте [291].

Основываясь на опубликованных данных [292-294] о свойствах полифенольных соединений, фенолокислот, полисахаридов, каротинов, ксантофиллов, хлорофиллов и др. БАВ, а также экстрагирующей способности растворителей, мы предположили, что последовательная экстракция порции сырья растворителями в порядке уменьшения их полярности, позволит получить каждую последующую фракцию, «неотягощенную» сопутствующими полярными соединениями [295-297].

При построении эксперимента нами была предложена схема разделения каротиноидов и хлорофиллов (Рисунок 3.9).

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.

На первом этапе получения фракции, содержащей каротиноиды и хлорофиллы, навеску листьев крапивы предварительно обрабатывали 4 % раствором натрия гидрокарбоната в соотношении 1:10. Настаивание вели в течение 2 часов. Условия этого этапа разделения ранее были апробированы экспериментально и опубликованы [291, 297]. Обработанную таким образом навеску сырья промывали водой очищенной до нейтральной реакции среды по универсальному индикатору.

Далее поэтапно проводили получение суммарного экстракта, содержащего каротиноиды и хлорофиллы.



Рисунок 3.9 – Схема получения суммарной фракции, содержащей каротиноиды и хлорофиллы

Экстракция водорастворимых соединений: навеску сырья массой 5,0 г помещали в перколятор, заливали водой очищенной в соотношении 1:10 с учетом коэффициента водопоглощения – 1,8. Оставляли на сутки, после чего растворитель сливали, а обработанное сырье отжимали и использовали далее. Водная вытяжка в последующих технологических операциях не использовалась.

Для подтверждения нашего предположения об отсутствии липофильных веществ в водном извлечении мы сочли целесообразным проанализировать его спектр поглощения (Рисунок 3.10).

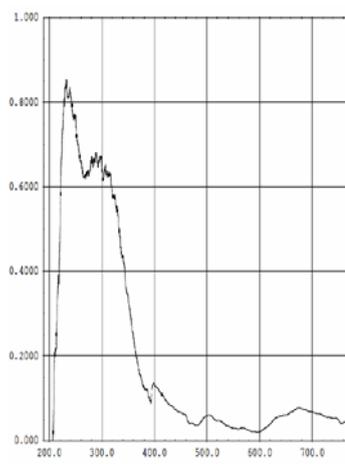


Рисунок 3.10 – УФ-спектр поглощения водной вытяжки из листьев крапивы

Характер спектра поглощения водного извлечения из крапивы двудомной листьев (Рисунок 3.10) позволяет сделать предположение о том, что, вероятней всего, в водную фазу переходят водорастворимые соединения листьев крапивы (полисахариды, аскорбиновая кислота, аминокислоты, дубильные вещества и др.). Полифенольные соединения в вытяжке отсутствовали. В дальнейшей работе водное извлечение не использовалось.

Экстракция полярных соединений, растворимых в 40 % спирте этиловом: сырье, оставшееся после предварительной обработки водой очищенной, заливали спиртом этиловым 40 % из расчета 1:10 и настаивали в течение суток, после чего растворитель сливали. Полученную вытяжку анализировали на содержание БАВ (Рисунок 3.11), а сырье отжимали и использовали далее.

Как предполагалось, в течение суток данный растворитель должен был экстрагировать максимальное количество полярных соединений. Для подтверждения этого предположения и установления оптимального времени

настаивания сырья со спиртом этиловым 40 % предварительно была изучена динамика экстракции. Извлечение из листьев крапивы, полученное спиртом этиловым 40 %, представляло собой прозрачную жидкость желто-коричневого цвета с едва уловимым зеленым оттенком.

В ходе эксперимента измерялись спектры поглощения извлечений, полученных настаиванием сырья спиртом этиловым 40 % в соотношении 1:10 в течение 12, 24, 36, 48 часов (Рисунок 3.11, на примере серии 11.06.14).

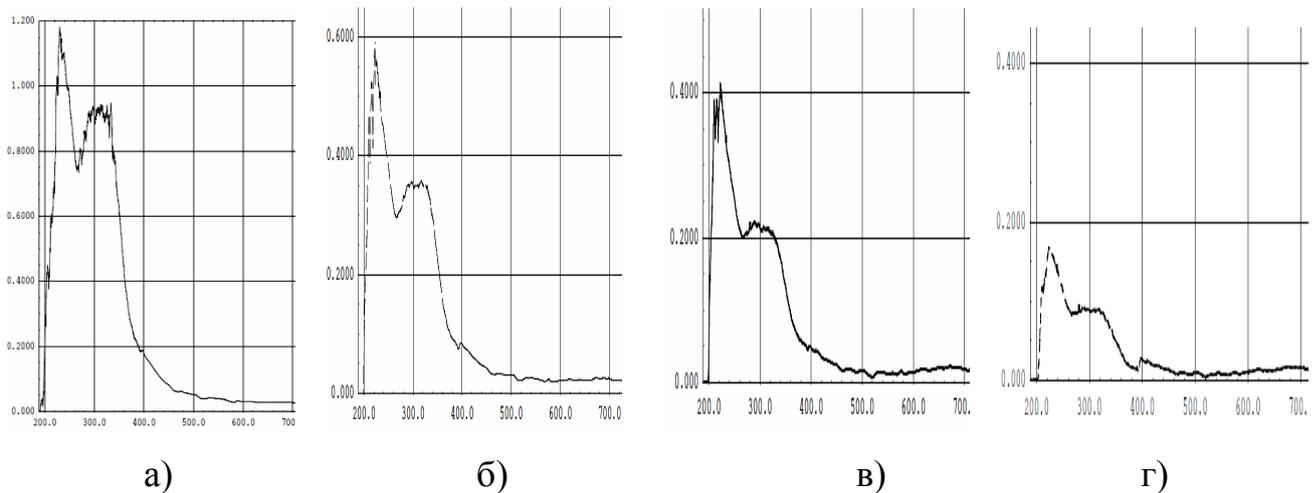


Рисунок 3.11 – Спектр поглощения вытяжки после настаивания сырья со спиртом этиловым 40 % в течение 12 (а), 24 (б), 36 (в), 48 (г) часов

Положения максимумов поглощения в интервалах от 200-250 нм и от 280 до 320 нм, в частности при 230, 279 и 320 нм, свидетельствуют о присутствии в извлечении соединений, характеризующихся наличием цепи сопряжения. Профиль спектров поглощения извлечений, полученных спиртом этиловым 40 %, по положению максимумов поглощения практически идентичен таковому водного извлечения, что подтверждает экстракцию полярных соединений обоими этими растворителями.

Сравнение интенсивностей поглощения спектров показало, что максимальное количество БАВ экстрагируется спиртом этиловым 40 % из сырья в период от 12 до 24 часов. За первые сутки экстракции содержание полярных соединений уменьшилось значительно, при этом характер спектра остался прежним. На основании этих данных для дальнейшей работы было выбрано время настаивания листьев крапивы со спиртом этиловым 40 % – 24 часа.

Сравнив профили спектров поглощения извлечений, полученных экстракцией водой и спиртом этиловым 40 %, и обобщив результаты динамики экстракции (Рисунок 3.10, 3.11), мы пришли к выводу о том, что стадию настаивания с водой очищенной можно исключить из технологической схемы. Это решение продиктовано идентичностью спектров поглощения, а следовательно, и составов фракций, полученных обоими растворителями. Кроме того, исключение настаивания с водой очищенной сокращает время технологического процесса на 24 часа.

Далее согласно предварительно разработанному алгоритму (Рисунок 3.8), сырье, остающееся после обработки спиртом этиловым 40 %, следует подвергнуть обработке спиртом этиловым 70 % для очистки его от полифенольных соединений, в частности флавоноидов и гидроксикоричных кислот и частично хлорофиллов.

Экстракция соединений, растворимых в 70 % спирте этиловом: сырье, предварительно обработанное водой очищенной и спиртом этиловым 40 %, заливали спиртом этиловым 70 % из расчета 1:10 и настаивали в течение суток, затем растворитель сливали. Полученное извлечение подвергали анализу, сырье после отжима использовали далее.

При выборе условий экстрагирования мы исходили из того, что на этом этапе в извлечении, возможно, будут присутствовать органические кислоты (максимумы поглощения около 240 нм), флавоноиды (максимум около 440 нм) и хлорофиллы (максимумы поглощения около 670 нм)

Уточнение параметров обработки сырья спиртом этиловым 70 %, в частности, времени контакта сырья и экстрагента, было проведено экспериментально на основании сравнения интенсивности максимумов поглощения (Рисунок 3.12).

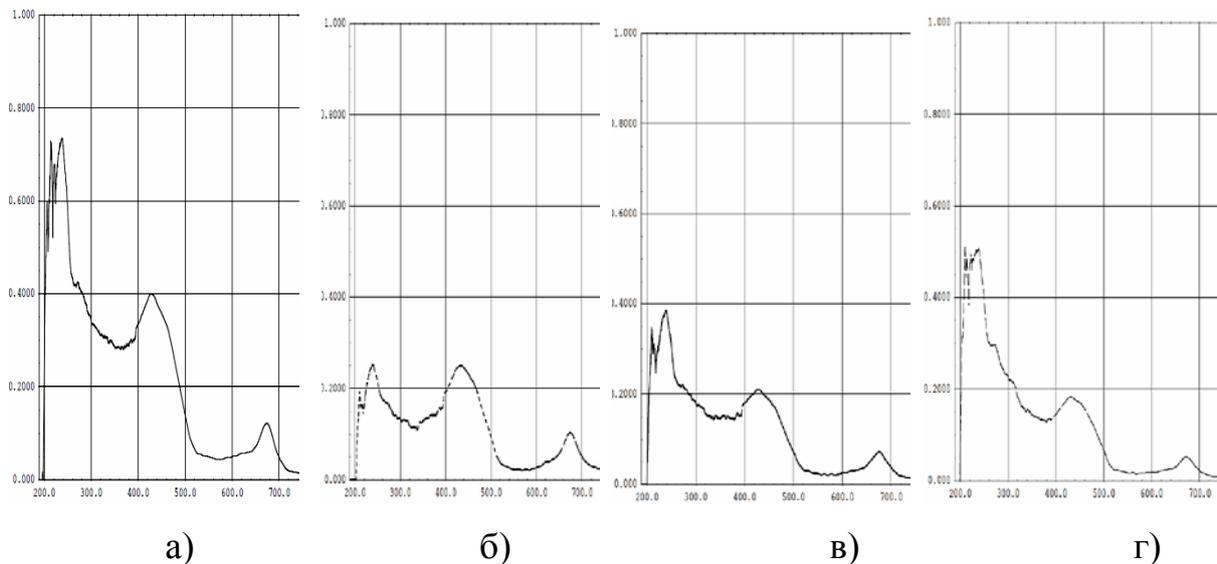


Рисунок 3.12 – Спектр поглощения вытяжки, полученной спиртом этиловым 70 %, после настаивания в течение 12 (а), 24 (б), 36 (в), 48 (г) часов

Величина оптической плотности для максимумов поглощения от 350 до 450 нм на рисунке от 3.12 (а) к 3.12 (б) снижается почти в 2 раза, а далее изменяется незначительно (Рисунок 3.12 (в, г)). Такая динамика извлечения явилась основанием для выбора времени контакта фаз при обработке сырья спиртом этиловым 70 % – 24 часа. Этот показатель был в дальнейшем применен при получении суммарного экстракта липофильных соединений.

В соответствии с предложенной схемой (Рисунок 3.8) для получения суммарного экстракта были использованы растворители, которые наиболее эффективно экстрагируют каротиноиды и хлорофиллы из любых объектов [52, 55].

Экстракция фракции липофильных соединений (каротиноиды, хлорофиллы): сырье, после предварительной обработки, как указано выше, 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.

Параллельно с получением экстрактов изучали динамику экстрагирования. Спектры поглощения извлечений, полученных с использованием спирта этилового 95 %, ацетона, хлороформа на примере серии 040914 представлены на рисунках 3.13 – 3.15.

Наличие максимумов поглощения в интервале длин волн от 360 до 450 нм свидетельствует о том, что все три растворителя экстрагируют сумму каротиноидов и хлорофиллов, что подтверждается наличием интенсивной полосы в области 600-670 нм.

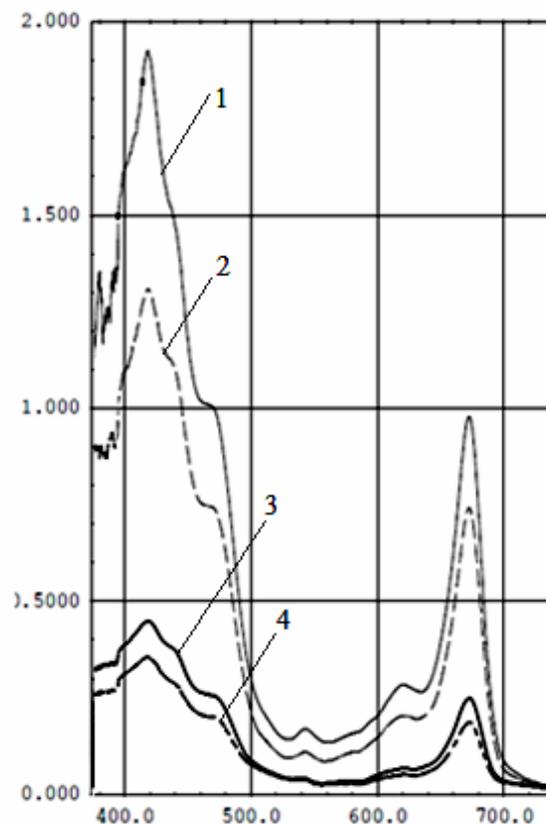


Рисунок 3.13 – Динамика экстракции липофильной фракции спиртом этиловым 95 %: 1 – 2-е сутки, 2 – 4-е сутки, 3 – 6-е сутки, 4 – 7-е сутки

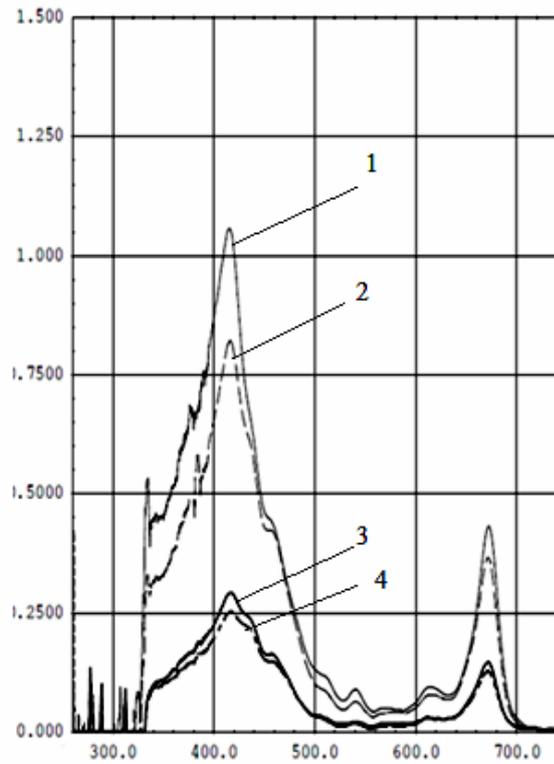


Рисунок 3.14 – Динамика экстракции липофильной фракции ацетоном:
1 – 2-е сутки, 2 – 4-е сутки, 3 – 6-е сутки, 4 – 7-е сутки

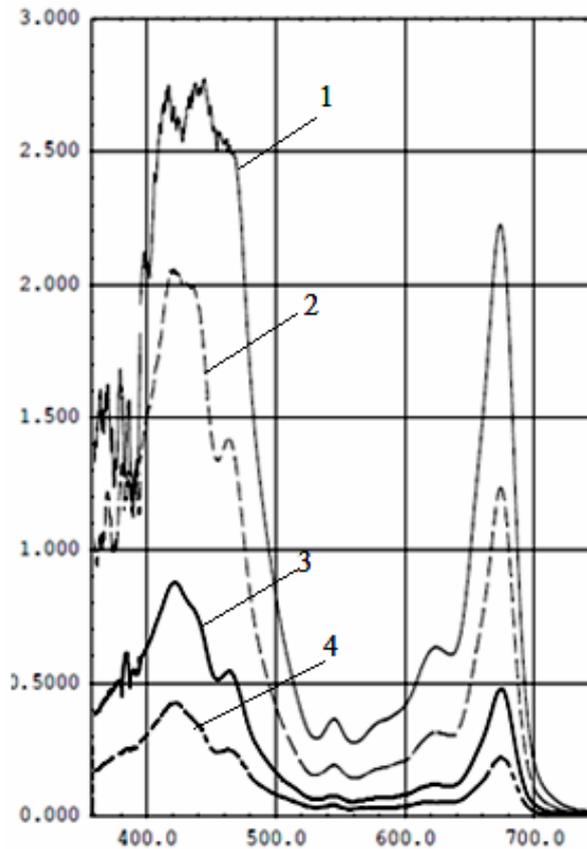


Рисунок 3.15 – Динамика экстракции липофильной фракции хлороформом:
1 – 2-е сутки, 2 – 4-е сутки, 3 – 6-е сутки, 4 – 7-е сутки

На рисунках 3.13 – 3.15 показана динамика экстрагирования суммы липофильной фракции листьев крапивы уже после их последовательной обработки растворами 40 %, 70 % спиртом этиловым, в результате которой сырье предполагалось «освободить» от гидрофильных соединений. Общий профиль спектров, отражающих динамику экстракции липофильной фракции, очень близок, что является дополнительным подтверждением того, что мы достигли поставленной цели, – очистили сырье от сопутствующих полярных соединений.

Таким образом, для дальнейшей работы были получены суммарные экстракты, содержащие каротиноиды и хлорофиллы. Теоретически разработанный алгоритм получения суммарного экстракта по ходу проведения эксперимента (Рисунок 3.8) был скорректирован, в частности, исключена стадия настаивания исходной навески ЛРС с водой очищенной.

Окончательная теоретически обоснованная и экспериментально подтвержденная схема получения суммарной вытяжки, содержащей каротиноиды и хлорофиллы, представлена на рисунке 3.16.

Необходимо отметить, что вытяжки, полученные при использовании спирта этилового 40 %, 70 %, не используются в предложенной технологии и являются отработанным (побочным) продуктом. В дальнейшем при необходимости создания безотходного производства можно будет провести коррекцию и оптимизацию технологической схемы с целью экономичного использования спирта этилового и возможного извлечения групп БАВ, которые экстрагировались в спирт этиловый 40 % и 70%.

Еще одно обстоятельство, требующее пояснения, – это возможность использования на последней стадии одного из трех растворителей. Предложенная схема является унифицированной и позволяет использовать на последней стадии экстрагент, который выберет сам исследователь, в зависимости от особенностей исходного сырья, его химического состава и полярности получаемого каротиноида. В связи с этим экстрагент последней стадии представлен на усмотрение технолога: либо спирт этиловый 95 %, либо хлороформ, либо ацетон.



Рисунок 3.16 – Окончательная схема получения модельного суммарного экстракта хлорофиллов и каротиноидов

Такая «относительность» в выборе растворителя нетрадиционна, однако она дает возможность другому исследователю или в дальнейшем производителю выбрать тот экстрагент, который имеет максимальное сродство к преобладающему каротиноиду сырья.

Например, при работе с крапивы двудомной листьями, по нашему мнению, более удобным в использовании является экстрагент спирт этиловый 95 %. Однако использование хлороформа как наименее полярного из трех предложенных экстрагентов максимально эффективно для экстракции суммы липофильных соединений (Рисунки 3.13– 3.15). При этом использование в качестве экстрагента ацетона или хлороформа в обязательном порядке требует дальнейшего контроля субстанции на остаточные количества этих растворителей. Использование спирта этилового упрощает эту задачу и позволяет исследователю или производителю выбрать свой путь получения каротиноида в рамках предложенного нами способа. Другой момент, который влияет на выбор экстрагента, – особенности технологического производства: при всех достаточно больших современных возможностях регулирования техники безопасности ацетон и хлороформ – это нелучшие варианты экстрагентов, что тоже может учесть и исследователь, и производитель.

Согласно схеме, представленной на рисунке 3.16, были осуществлены разделение и анализ полученного суммарного экстракта на фракции каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов.

3.6.1.3 Количественное содержание каротиноидов и хлорофиллов в полученном суммарном экстракте

В связи с тем что для дальнейшей работы был необходим суммарный экстракт, содержащий каротиноиды и хлорофиллы, полученный модельный экстракт из крапивы двудомной листьев был проанализирован на присутствие этих соединений.

Расчет содержания каротиноидов проводили в пересчете на СО лютеина, а хлорофиллов – по методике, предложенной в работах [262 –264], где содержание хлорофиллов определяется при их совместном присутствии с каротиноидами (Таблица 3.17).

Таблица 3.17 – Содержание каротиноидов и хлорофиллов в суммарной спиртовом извлечении *

Серия сырья	Содержание суммы каротиноидов в пересчете на СО лютеина, %			
	\bar{x}	$S\bar{x}$	ΔX	$\varepsilon\%$
081214	0,02733	0,00031	0,00078	2,88
040914	0,02818	0,00032	0,00083	2,94
11.06.14	0,02715	0,00035	0,00089	3,29
Содержание суммы хлорофиллов, %				
081214	0,30446	0,00404	0,01038	3,29
040914	0,31033	0,00413	0,01061	3,32
11.06.14	0,29756	0,00284	0,00729	2,44

* – данные таблицы получены по результатам шести параллельных определений, обработаны статистически ($p=0,95$).

Как показали результаты, среднее содержание каротиноидов составляет около 0,0276 %, хлорофиллов – 0,3041 % в суммарном экстракте.

По результатам, представленным в таблице 3.17, можно констатировать эффективность экстракции на уровне 79 %.

Таким образом, изучение условий получения суммарной липофильной фракции, содержащей сумму каротиноидов и хлорофиллы, а также экспериментальный выбор условий разделения этих соединений в целом подтвердили правильность изначально предположенного алгоритма и позволили скорректировать некоторые первичные теоретические позиции.

3.6.1.4 Выбор условий разделения суммарного экстракта, содержащего каротиноиды и хлорофиллы

Согласно дизайну этого фрагмента исследования (Рисунок 3.8) после получения модельной суммарной липофильной фракции, содержащей каротиноиды и хлорофиллы, необходимо провести ее разделение на отдельные фракции. При разработке способа разделения этих БАВ за основу была взята методика, описанная в работах [289, 290].

Суммарные спиртовое, ацетоновое и хлороформное извлечения в отдельности упаривали под вакуумом до минимального объема 1 мл. Упаренные липофильные фракции растворяли в петролейном эфире, переносили в делительные воронки (делительная воронка №1) и встряхивали до полного растворения.

Предварительно были проведены испытания с 25, 50 и 100 мл петролейного эфира. Как показали результаты, растворение фракции каротиноидов и хлорофиллов происходило быстрее в 50 и 100 мл растворителя, вместе с тем 25 мл петролейного эфира было достаточно для получения раствора, поэтому этот объем был взят в качестве опорного.

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.

При выборе условий разделения этих соединений следовало определить оптимальное время экстракции, которого должно было быть достаточно для полного перехода ксантофиллов и хлорофиллов в спиртовую слой. Очевидно, что если все хлорофиллы и ксантофиллы будут экстрагированы в спиртовую фазу, то оптическая плотность этого раствора и профиль электронного спектра в определенный момент стабилизируются.

Через 20, 30, 40 мин встряхивания системы пробы отбирались и анализировались (Рисунок 3.17).

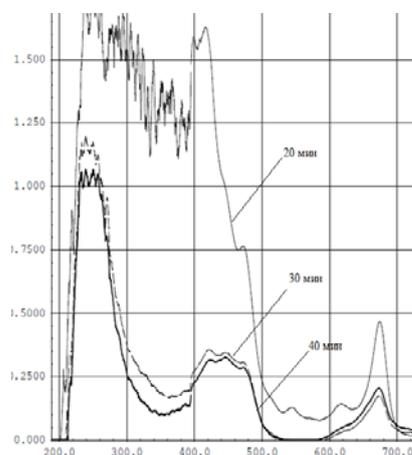


Рисунок 3.17 – Спектры поглощения спиртовой фазы

После 30 мин встряхивания системы петролейный эфир/спирт этиловый 95 % величина оптической плотности и положение максимумов для спиртового слоя оставались неизменными. Это позволило установить время экстракции на этом этапе разделения – 30 мин.

Профили спектров поглощения спиртовой фазы показали, 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).

Таким образом, 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. Спиртовые извлечения объединяли в делительной воронке №2.

Оставшаяся фаза петролейного эфира в делительной воронке №1 предположительно содержит каротины и следы хлорофиллов. Чтобы отделить каротины от следовых количеств хлорофиллов, последние следовало перевести в гидрофильные омыленные формы, которые впоследствии можно экстрагировать спиртом этиловым.

В качестве омыляющего агента использовали 20 % раствор гидроксида натрия, т.к. известно, что этот реагент полностью омыляет хлорофиллы листьев крапивы [277]. С этой целью в делительную воронку №1 добавляли 10 мл 20% раствора натрия гидроксида и 25 мл спирта этилового 95 %, систему встряхивали в течение 30 мин. После расслоения системы спиртовую фазу, содержащую омыленные хлорофиллы, сливали. Слой петролейного эфира окрашен в ярко желто-оранжевый цвет, спиртовая фаза за счет содержания хлорофиллов имеет зеленую окраску (Рисунок 3.18).

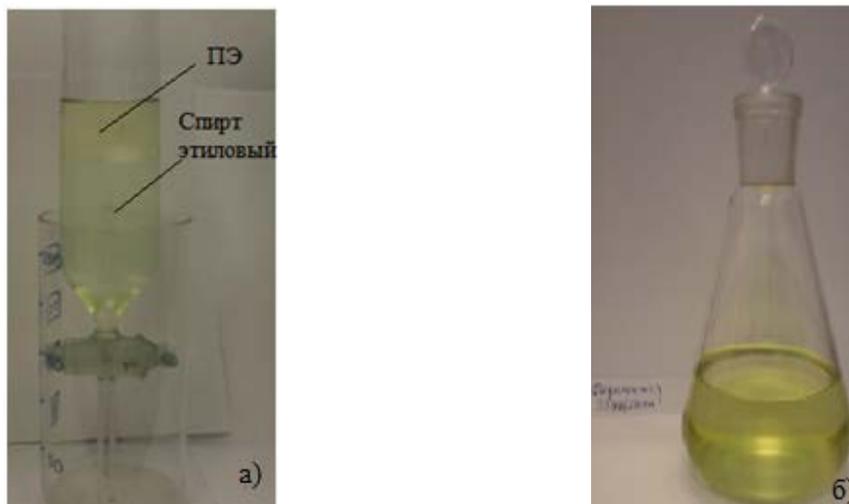


Рисунок 3.18 – Разделение каротинов и хлорофиллов

а) фаза со спиртом этиловым, содержащая хлорофиллы, и фаза с петролейным эфиром (ПЭ), содержащая каротины; б) объединенная фракция петролейного эфира с каротинами

Далее измеряли спектры поглощения раствора в петролейном эфире (Рисунок 3.19).

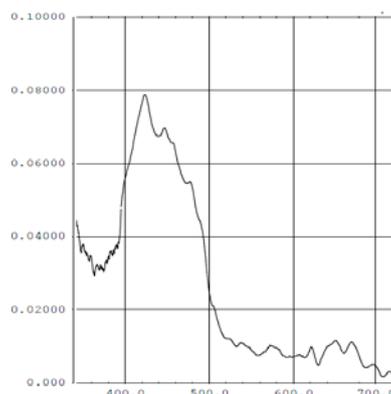


Рисунок 3.19 – Спектр поглощения раствора петролейного эфира после экстракции омыленных хлорофиллов

Характер спектра поглощения этого раствора подтверждает, что петролейноэфирная фракция содержит каротины. Расчет количественного содержания этих соединений осуществляли в пересчете на 0,0002 % раствор СО β -каротина в петролейном эфире. Содержание суммы каротинов составляет 7,20 мг% (серия 081214), 9,03 мг% (серия 040914), 7,06 мг% (серия 11.06.14). Таким образом, в среднем содержание каротинов, извлеченных из листьев крапивы, составило 7,80 мг%.

Согласно плану эксперимента следующим этапом было разделение компонентов объединенной спиртовой фракции, находящейся в делительной воронке №2. Основываясь на свойствах ксантофиллов и хлорофиллов и их растворимости, а также внешнем виде извлечения, мы предположили, что объединенный спиртовой экстракт должен содержать ксантофиллы и частично хлорофиллы. Хлорофиллы являются менее полярными веществами, чем ксантофиллы, поэтому предполагалось, что следы хлорофиллов экстрагируются в петролейный эфир, а ксантофиллы будут сконцентрированы в спиртовой фазе. Для проверки данного предположения к объединенному спиртовому экстракту приливали 25 мл петролейного эфира, раствор встряхивали 30 мин. Возможность разделения ксантофиллов и хлорофиллов подтверждается измерением спектров поглощения фракций после расслоения фаз. Положение максимума поглощения при 667 нм свидетельствует о том, что в петролейный эфир переходят следовые количества хлорофилла.

Измерение спектра поглощения спиртовой фракции после разделения ксантофиллов и хлорофиллов показало, что спектр имеет профиль, характерный для ксантофиллов. Наличие трех максимумов поглощения при 422, 445 и 474 нм позволило предположить, что в спиртовой фазе содержится лютеин (Рисунок 3.20).

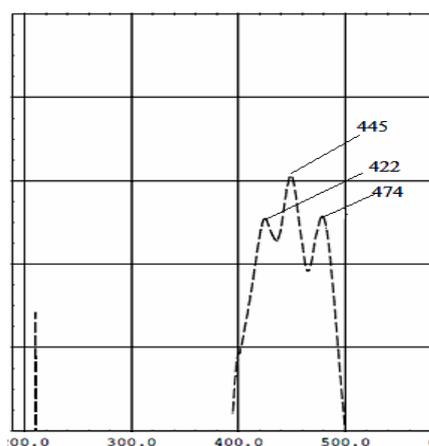


Рисунок 3.20 – Спектр поглощения спиртовой фазы

После разделения ксантофиллов и хлорофиллов содержание ксантофиллов в спиртовой фазе было следующим: 2,023 мг% (серия 081214), 2,194 мг% (серия 040914) и 2,052 мг% (серия 11.06.14), что в среднем составляет 2,090 мг%.

Сопоставляя теоретические предположения и их экспериментальное подтверждение, мы предложили алгоритм разделения каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов при их совместном присутствии (Рисунок 3.21).

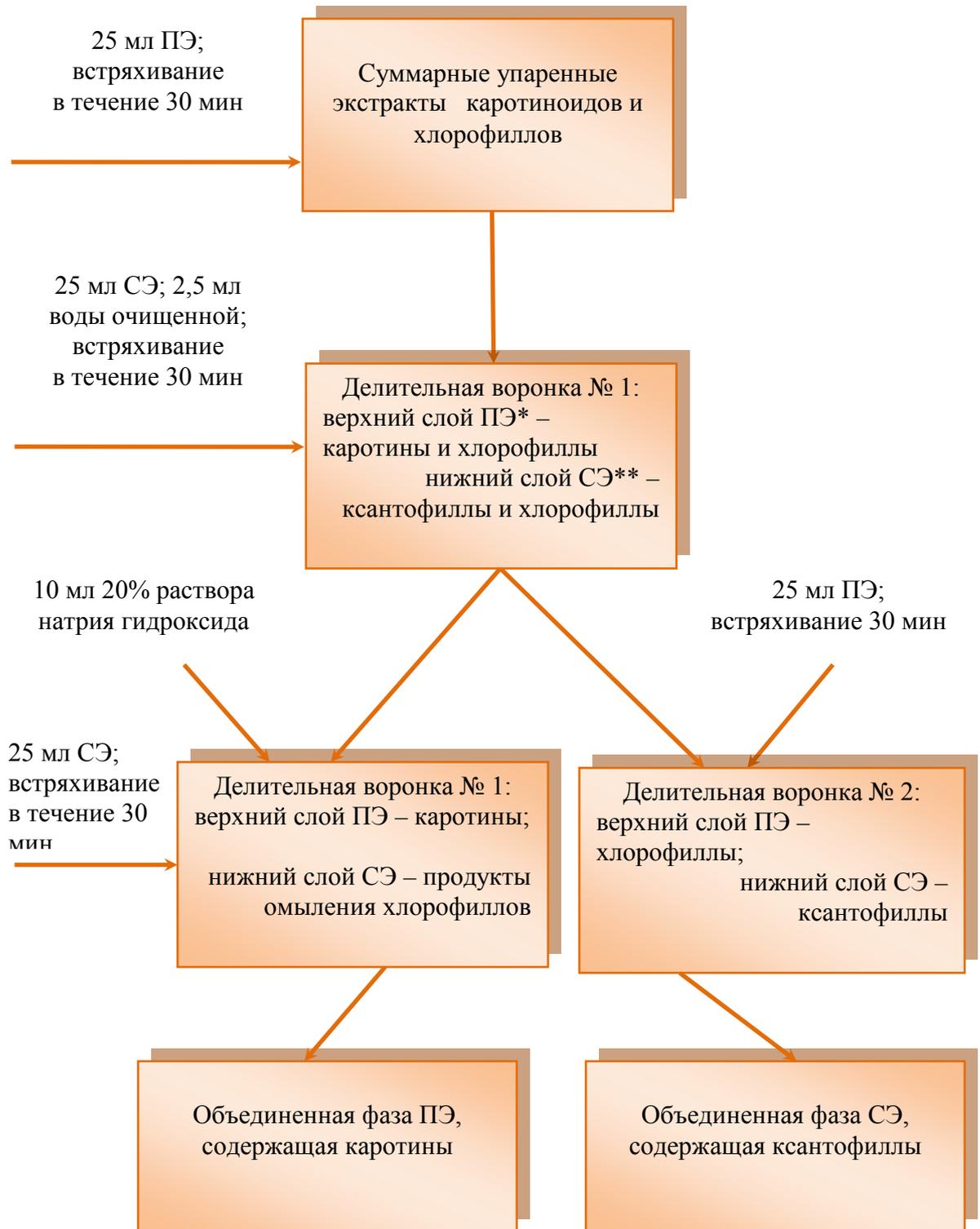


Рисунок 3.21 – Предлагаемая схема разделения каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов (*ПЭ – петролейный эфир, **СЭ – спирт этиловый)

Необходимо подчеркнуть, что до настоящего времени преимущественным способом разделения каротиноидов и хлорофиллов является применение метода колоночной хроматографии. Предложенное нами экстракционное разделение этих классов соединений основано на их избирательном сродстве к растворителям различной полярности.

Таким образом, на основании теоретических и экспериментальных данных предложен способ разделения каротиноидов и хлорофиллов методом жидкостной экстракции. Предложенная схема позволяет провести изолирование каротинов и ксантофиллов, в частности лютеина, что может быть использовано для получения индивидуальных каротиноидов при их совместном присутствии с хлорофиллами в зеленых частях практически всех растений.

3.6.2 Особенность получения каротиноидов из сырья животного происхождения на примере астаксантина

Учитывая особенности накопления и биотрансформации астаксантина в природных источниках животного происхождения, изложенные в разделе 1.3, далее мы провели детализацию способа получения каротиноидов применительно к «животным каротиноидам» на примере астаксантина.

Свободный астаксантин извлекается из сырья менее полярными растворителями, а его эфиры – более полярными, то при экстракции, как правило, неполярных каротиноидов обычно происходит одновременное извлечение всей липофильной фракции сырья [52, 53, 265, 298]. Это диктует необходимость адаптации общей технологической схемы, представленной на рисунке 3.7, в частности стадии ТП 3.

В качестве исходного сырья были выбраны панцири креветок как наиболее доступное сырье, содержащее астаксантин. В соответствии с данными литературы креветки могут содержать до 15 мг% астаксантина [130, 265].

Из данных литературы [52, 53, 265] следует, что свободный астаксантин можно отделить от его эфиров и других сопутствующих липофильных

соединений, последовательно используя в качестве экстрагентов пары растворителей с резко отличающимся значением диэлектрической проницаемости [269], например: ацетон ($\epsilon=21,3$) и н-гексан ($\epsilon=1,9$), спирт этиловый 95% ($\epsilon=25$) и хлороформ ($\epsilon=5,1$), спирт этиловый 95% ($\epsilon=25,0$) и н-гексан ($\epsilon=1,9$), спирт этиловый 95% ($\epsilon=25,0$) и петролейный эфир ($\epsilon=2,1$) [299].

На этапе предварительных исследований в качестве полярных растворителей для экстрагирования астаксантина из панцирей креветок нами были апробированы ацетон и спирт этиловый 95%, из группы малополярных – хлороформ и н-гексан.

н-Гексан характеризуется большей разницей в значениях диэлектрической проницаемости со спиртом этиловым 95 % и ацетоном. Кроме того, по данным литературы, н-гексан является приоритетным экстрагентом для липофильных соединений. На основании этого в качестве неполярного экстрагента нами был выбран н-гексан. Разница значений диэлектрической проницаемости была максимальная для пары растворителей – спирт этиловый 95 % и н-гексан, поэтому в качестве полярного растворителя был выбран спирт этиловый.

Необходимо отметить, что во всех исследованных растворителях астаксантин имеет выраженный максимум поглощения (Таблица 3.18), что позволяет использовать спектрофотометрию в качестве метода контроля над процессом экстракции.

Таблица 3.18 – Максимумы поглощения астаксантина в различных растворителях

Растворитель	Диэлектрическая проницаемость	Положение максимума поглощения, нм
Спирт этиловый 96%	25,0	478
Ацетон	21,3	480
Хлороформ	5,1	485
Петролейный эфир	2,1	468
н-Гексан	1,9	468

С учетом теоретических данных [82, 83, 89, 92, 97] и собственных предварительных исследований [278-280] был составлен алгоритм получения астаксантина из панцирей креветок, представленный на рисунке 3.22.



Рисунок 3.22 – Общая технологическая схема получения ксантофиллов из сырья животного происхождения

Первичным экстрагентом, который позволяет получить суммарный экстракт как свободных каротиноидов, так и их эфиров, является ацетон. Далее суммарный экстракт упаривается в роторном испарителе до минимального объема, после чего проводится экстракция смесью н-гексана и спирта этилового 95 % в соотношении 1:1. В результате этой технологической операции образуются две фазы: спиртовая фракция (а), которая содержит более полярный свободный астаксантин и гексановая (б), содержащая эфиры ксантофиллов и жирные кислоты. Измерение спектра поглощения спиртовой фракции (а) показало наличие максимума поглощения при 478 нм, что характерно для свободного астаксантина (Рисунок 3.23).

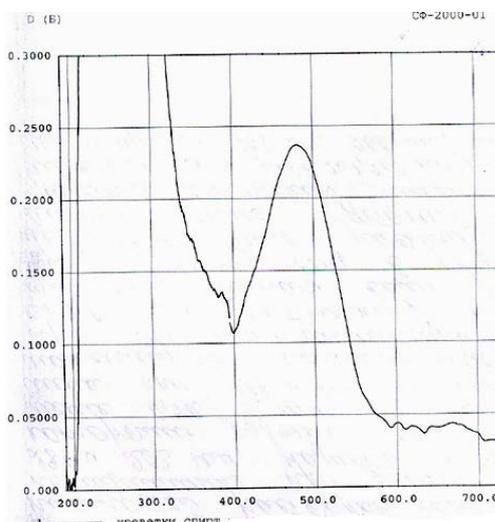


Рисунок 3.23 – Спектр поглощения спиртовой фракции (а)

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 с более выраженными основными свойствами, чем у 4 % раствора натрия гидрокарбоната. Кроме того, необходимо более длительное воздействие щелочного агента на гексановую фазу (б), содержащую эфиры жирных кислот, поэтому предлагается двухчасовая экспозиция [265, 278].

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 операцией является разделение 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 составило 11,5 мг%, 9,8 мг%, 12,0 мг%.

Данные, полученные экспериментально, согласуются с теоретическими, согласно которым содержание астаксантина в высушенном сырье может достигать 15 мг%.

Таким образом, предложенная схема позволяет проводить получение свободных каротиноидов, в частности астаксантина из сырья животного происхождения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 3

Теоретически обоснован и экспериментально подтвержден унифицированный способ получения субстанций каротиноидов из источников растительного и животного происхождения. Научная новизна предложенного подхода подтверждена патентом РФ № 2648452 «Способ получения каротиноидов».

На базе результатов математических расчетов, в частности, построении математической модели на основе уравнения регрессии первого порядка, установлены параметры технологических показателей, максимально влияющих на эффективность получения каротиноидов. Выявленное количественное влияние пяти факторов на получение каротиноидов позволит в дальнейшем упростить масштабирование методики. С применением метода крутого восхождения проведена оптимизация предложенной унифицированной технологии получения субстанций каротиноидов. Построение математической модели экстракции каротиноидов проведено впервые.

Впервые предложен и апробирован подход, позволяющий проводить экстракционное разделение каротиноидов и хлорофиллов при их совместном присутствии, научный приоритет которого закреплен патентом РФ №2659165 «Способ разделения каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов листьев крапивы двудомной».

Проведена детализация унифицированной технологии получения каротиноидов применительно к сырью животного происхождения на примере выделения астаксантина из панцирей креветок.

Накопление экспериментального и теоретического материала по совмещенной экстракции соединений различной полярности позволит в дальнейшем при систематизации и математико-статистической обработке этих данных получить более сложные теоретические модели, способные проводить оптимизацию экстракции БАВ различной полярности, учитывая количественное влияние каждого технологического параметра.

Положительным экспериментальным результатом технологического фрагмента исследования являются полученные субстанции каротиноидов-маркеров – β -каротина, ликопина, лютеина, астаксантина и предложенная технология их получения, т.е. положительная реализация функции блока А1 (Рисунок 2.4, Глава 2), что может быть учтено в процессе построения обобщенной IDEF0 методологии создания ЛФ на основе каротиноидов.

ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИИ АНАЛИТИЧЕСКОГО СОПРОВОЖДЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ КАРОТИНОИДОВ

Как показано в IDEF0-модели дизайна исследования (Рисунок 2.4, Глава 2) на следующем этапе необходимо провести всестороннее аналитическое исследование полученных субстанций – блок А2 (Рисунок 2.4, Глава 2). Эта часть работы является необходимой и связующей между получением субстанций каротиноидов – блок А1 (Рисунок 2.4, Глава 2) и их стабилизацией и получением оптимальной ЛФ – блок А3 (Рисунок 2.4, Глава 2). Кроме того, основной планируемый результат – общие аналитические подходы к анализу каротиноидов является значимым компонентом обобщенной IDEF0 методологии создания ЛФ на основе каротиноидов.

4.1 Анализ каротиноидов методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса

Неотъемлемым этапом получения фармацевтических субстанций каротиноидов является поэтапное установление структуры, подлинности, чистоты и количественного содержания. С учетом теоретических и экспериментальных достижений в этой области [300-303] нами был осуществлен анализ каждого полученного каротиноида на трех лабораторных сериях физико-химическими методами.

С целью подтверждения структуры и установления подлинности полученных каротиноидов образцы были проанализированы методом ЯМР-спектроскопии.

Этот метод широко используется для изучения каротиноидов благодаря созданию более мощных и чувствительности приборов с высоким разрешением. Применение компьютерных программ для прогнозирования и расшифровки ЯМР-спектров существенно упростило процесс получения информации и расширило ее объем и качество [302, 303].

При исследовании каротиноидов этим методом основной проблемой является сложность получения «качественных» спектров и, как следствие, достоверность их «чтения». Причиной этих трудностей является «перенаселенность» сигналов, отображаемых на спектре из-за присутствия разных по природе и свойствам изолированных и сопряженных двойных связей, карбонильных, карбоксильных групп, ароматических радикалов, а также групп с сильной диамагнитной изотропией таких, как тройные связи. Использование высокочастотной ЯМР-спектроскопии позволяет «расщепить» мультиплеты и выделить полосы, ранее «скрывавшиеся» за другими полосами. Это способствует выявлению более подробных и тонких различий в структуре крайне близких по строению соединений, что, несомненно, является преимуществом в анализе каротиноидов [304,305].

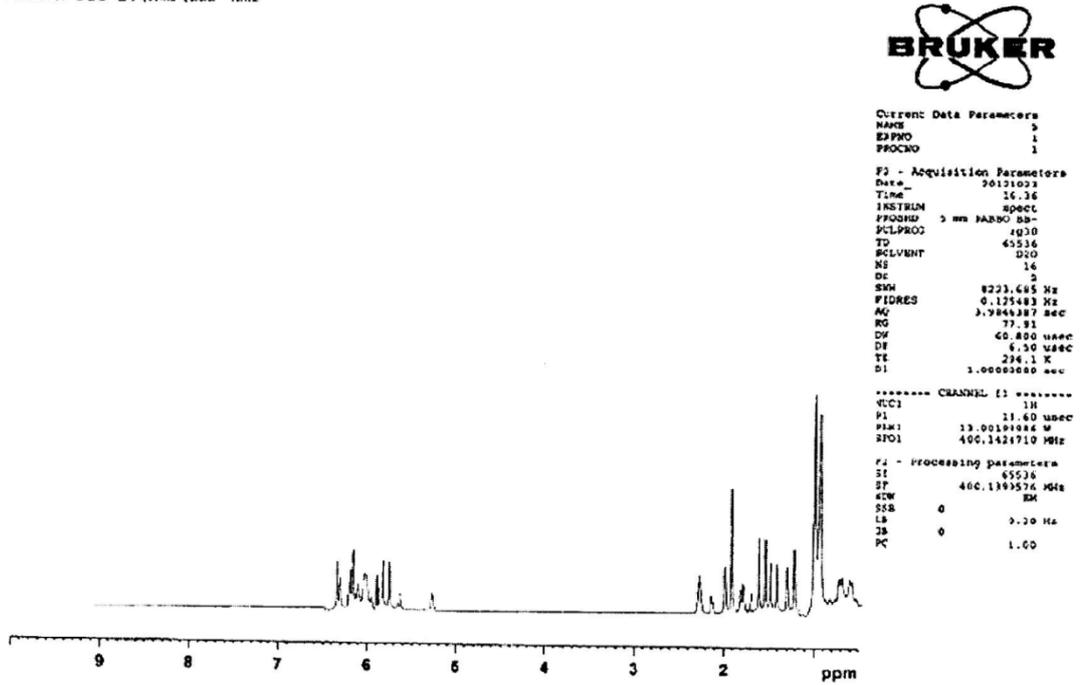
По сравнению с УФ-видимой, ИК-спектроскопией и масс-спектрометрией метод ЯМР предоставляет исследователю более точную информацию о длине и пространственном расположении химических связей [117, 306], что значительно повышает его информативность и ставит на первое место среди методов, позволяющих устанавливать структуры полученных каротиноидов.

При выборе метода ЯМР предпочтение следует отдавать ^1H -ЯМР методу, поскольку в анализе каротиноидов он более информативен [55, 117, 265].

Идентификацию полученных нами каротиноидов проводили в два этапа: вначале соотносили сигналы характерные для полиеновой цепи, а на втором этапе анализировали сигналы, характерные для концевых групп.

Регистрацию ЯМР-спектров проводили в условиях, описанных в разделе 2.3 (Рисунки 4.1-4.4, Таблица 4.1).

PROTON D2O E:\nmr\222 nmr

Рисунок 4.1 – ЯМР-спектр субстанции β -каротина

PROTON D2O E:\nmr\220 nmr

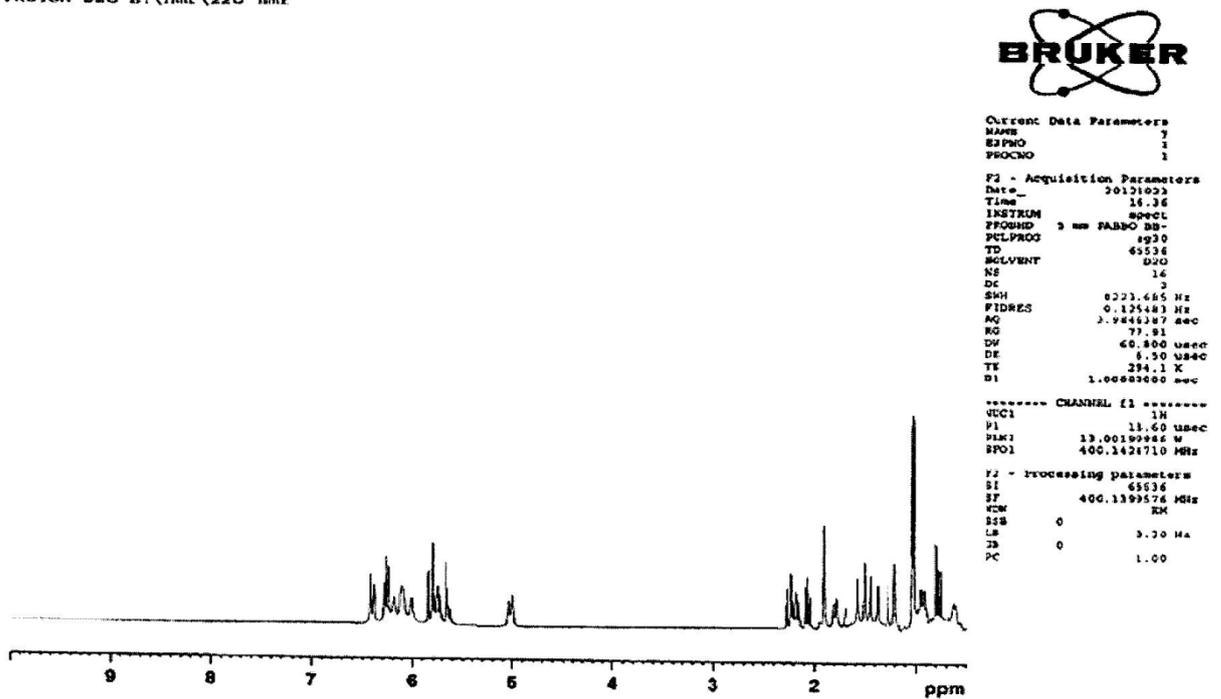


Рисунок 4.2 – ЯМР-спектр субстанции ликопина

PROTON D2O E:\nmr\212 nmr



```

Current Data Parameters
NAME          1
EXPRO        1
PROCNO       1

F1 - Acquisition Parameters
Date_        20121023
Time         14.36
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm MARIAS BB-
PULPROG      zg30
TD           65536
SOLVENT      D2O
NS           16
DS           3
SSB          0
FIDRES       0.125483 Hz
AQ           3.9044187 sec
RG           77.91
CW           40.800 usec
DE           6.50 usec
TE           274.1 K
D1           1.00000000 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1         1H
P1           11.60 usec
P1M1        13.0019996 M
SFO1        400.1424710 MHz

F2 - Processing parameters
SI           65536
SF           400.139576 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           0.20 Hz
GB           0
PC           1.00

```

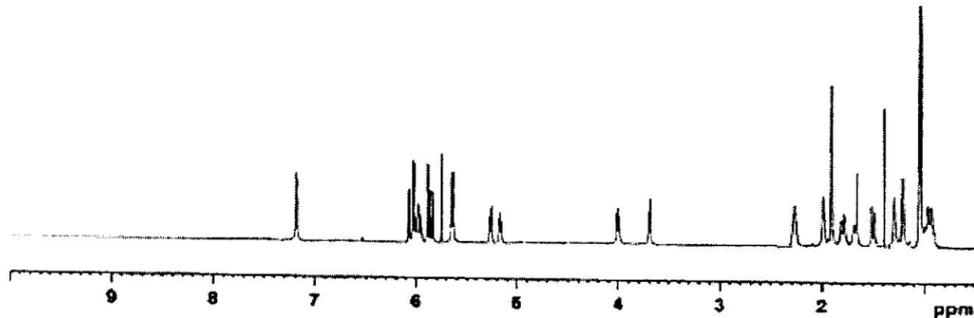


Рисунок 4.3 – ЯМР-спектр субстанции лютеина

PROTON D2O E:\nmr\211 nmr



```

Current Data Parameters
NAME          1
EXPRO        1
PROCNO       1

F1 - Acquisition Parameters
Date_        20121023
Time         14.36
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm MARIAS BB-
PULPROG      zg30
TD           65536
SOLVENT      D2O
NS           16
DS           3
SSB          0
FIDRES       0.125483 Hz
AQ           3.9044187 sec
RG           77.91
CW           40.800 usec
DE           6.50 usec
TE           274.1 K
D1           1.00000000 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1         1H
P1           11.60 usec
P1M1        13.0019996 M
SFO1        400.1424710 MHz

F2 - Processing parameters
SI           65536
SF           400.139576 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           0.20 Hz
GB           0
PC           1.00

```

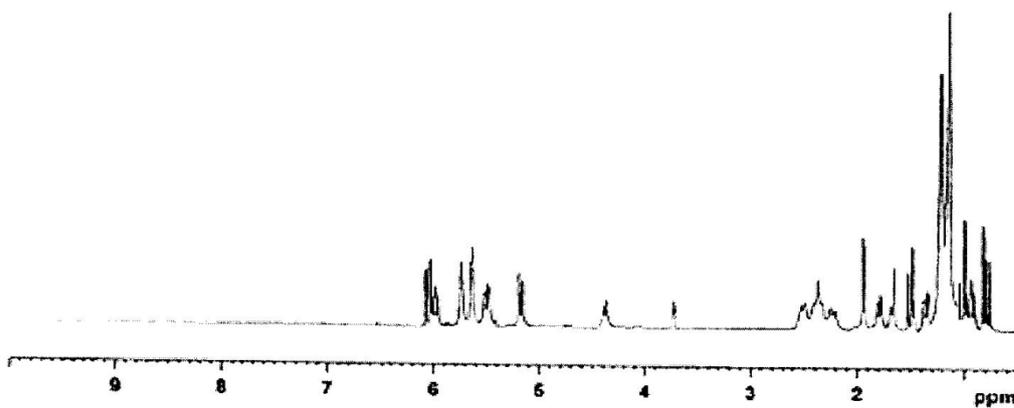


Рисунок 4.4 – ЯМР-спектр субстанции астаксантина

Установление структуры по характерным сигналам проводили по базе данных <http://sdb.sdb.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) [307].

Таблица 4.1 – Результаты исследования субстанций каротиноидов ¹H-ЯМР методом

Структурный фрагмент	β-Каротин, м.д.	Ликопин, м.д.	Лютеин, м.д.	Астаксантин, м.д.
1	2	3	4	5
Полиеновая цепь				
7,7'-H	6,162	6,491	6,122	6,295
8,8'-H	6,154	6,252	6,155	6,522
10,10'-H	6,153	6,180	6,154	6,381
11,11'-H	6,653	6,648	6,651	6,970
12,12'-H	6,351	6,353	6,362	6,504
14,14'-H	6,256	6,254	6,261	6,402
15,15'-H	6,630	6,627	6,644	6,772
Концевые группы				
1,1'-метил	1,028	1,688, 1612	0,849, 0,998, 1,074	1,291, 1,173
9,9',13,13' -метил	1,971	1,968	1,912, 1,970	1,994, 2,002
Характеристические структуры	5,5'-метил 1,719	2,2',6,6'-H, 5,111, 5,952	5,5'-метил 1,626, 1,739	5,5'-метил 1,796
	1,1'-метил 1,029	3,3',4,4'-2H 2,114	3-H 4,001	3,3'-H 4,363
			3'-H 4,250	3,3'-OH 4,581
			4'-H 5,554	

Наиболее характерные сигналы, соответствующие определенным протонам, представлены на рисунке 4.5.

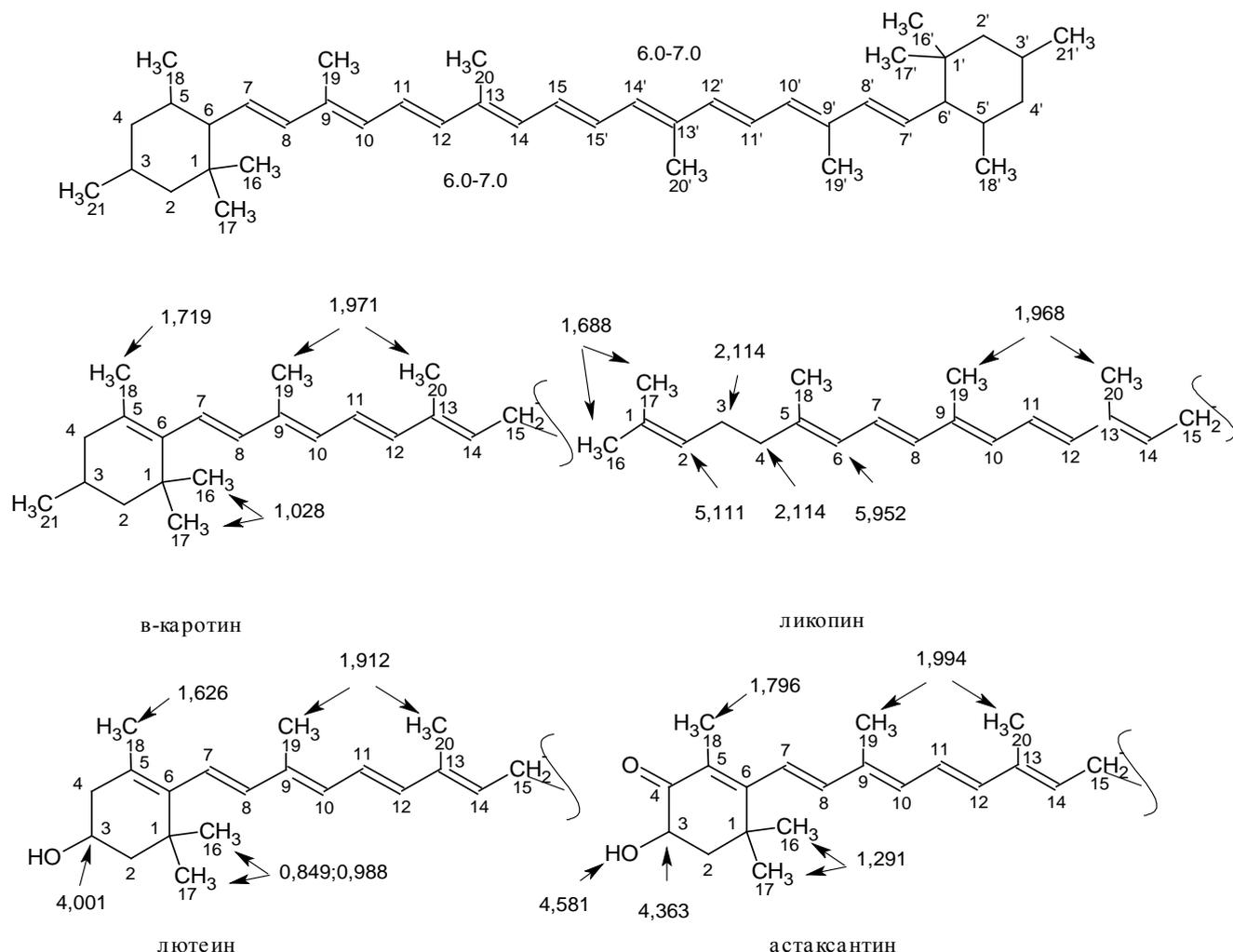


Рисунок 4.5 – Характерные сигналы протонов в молекулах каротиноидов

Таким образом, с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии нами подтверждено, что по предложенному унифицированному подходу к технологии получения субстанций каротиноидов в результате эксперимента были получены субстанции β -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина.

4.2 Идентификация каротиноидов методом масс-спектрометрии

Из информативных и высокоточных методов определения подлинности как органических, так и неорганических веществ необходимо отметить масс-спектрометрию [308]. В анализе природных каротиноидов масс-спектрометрия особенно важна, так как позволяет проводить идентификацию соединений с высокой точностью и достоверностью [309-311]. Исследования проводили в условиях, описанных в главе 2 (Рисунки 4.6 – 4.9).

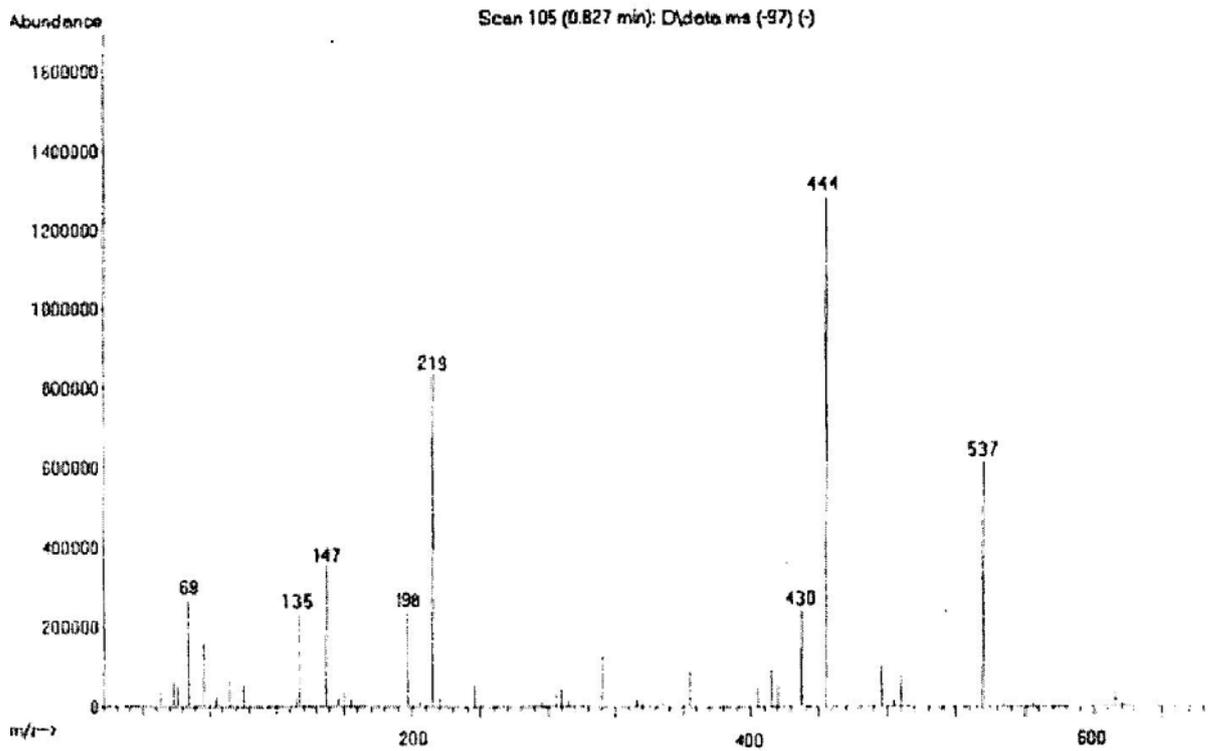
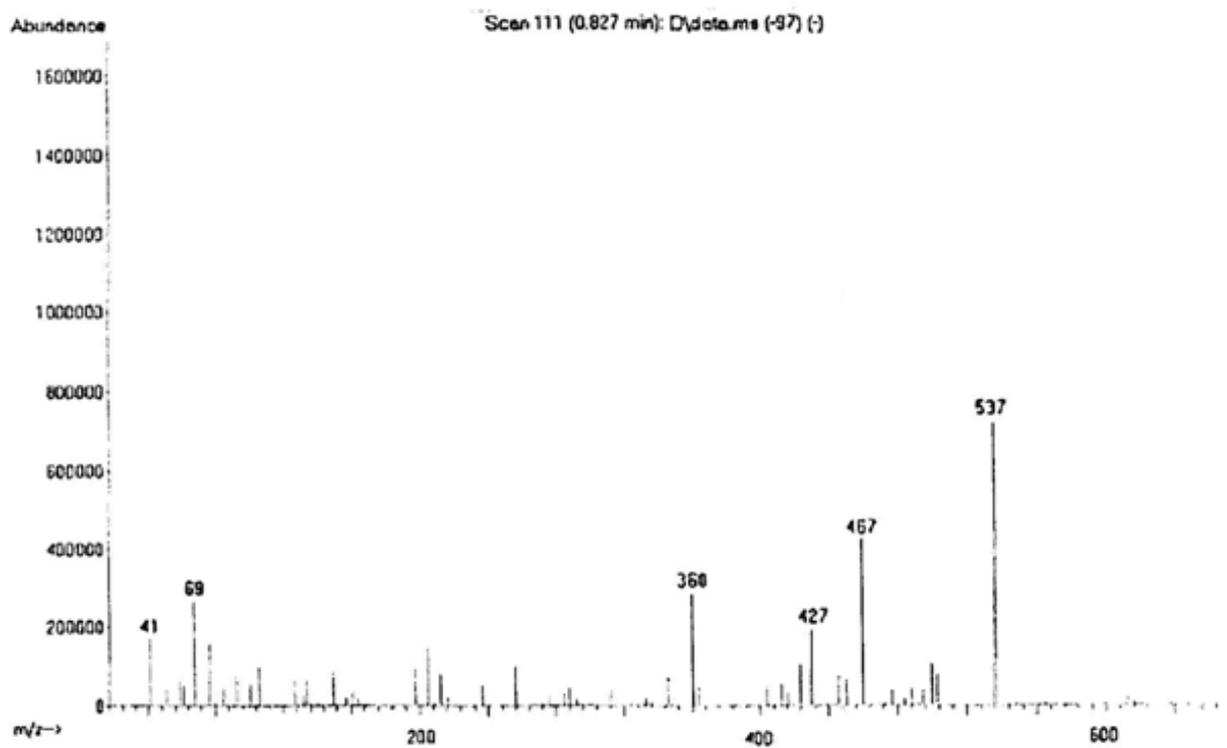
Рисунок 4.6 – Масс-спектр образца β -каротина

Рисунок 4.7 – Масс-спектр образца ликопина

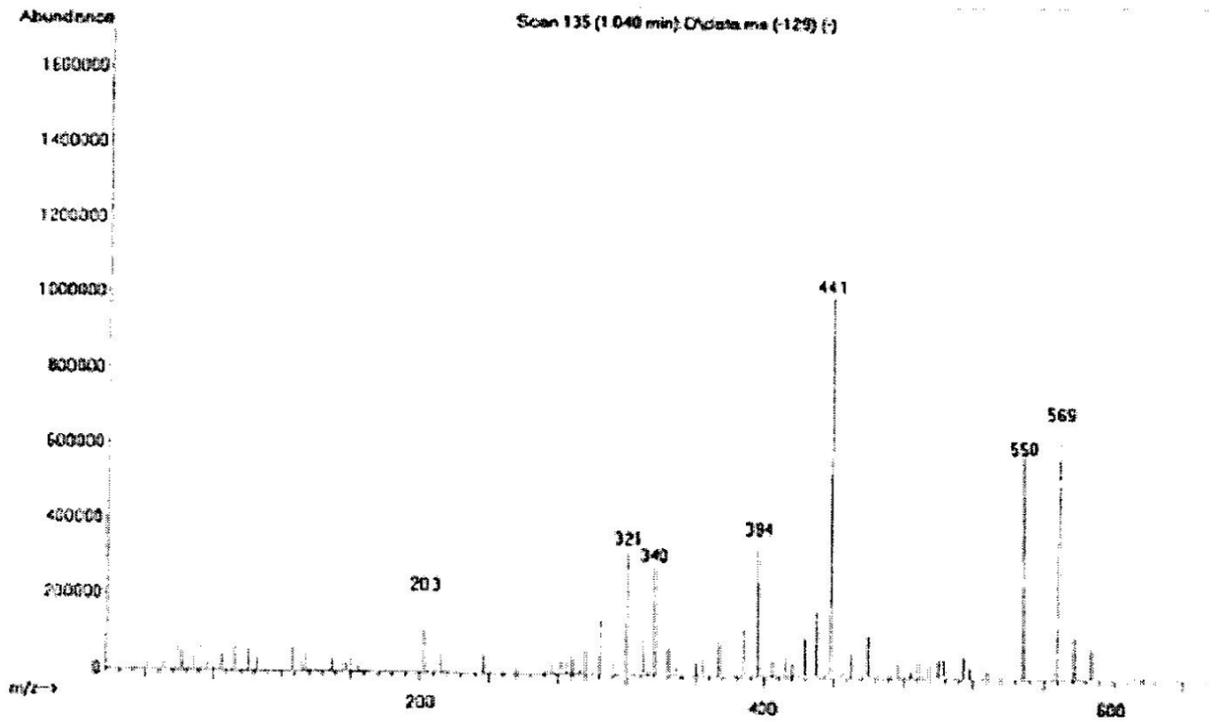


Рисунок 4.8 – Масс-спектр образца лютеина

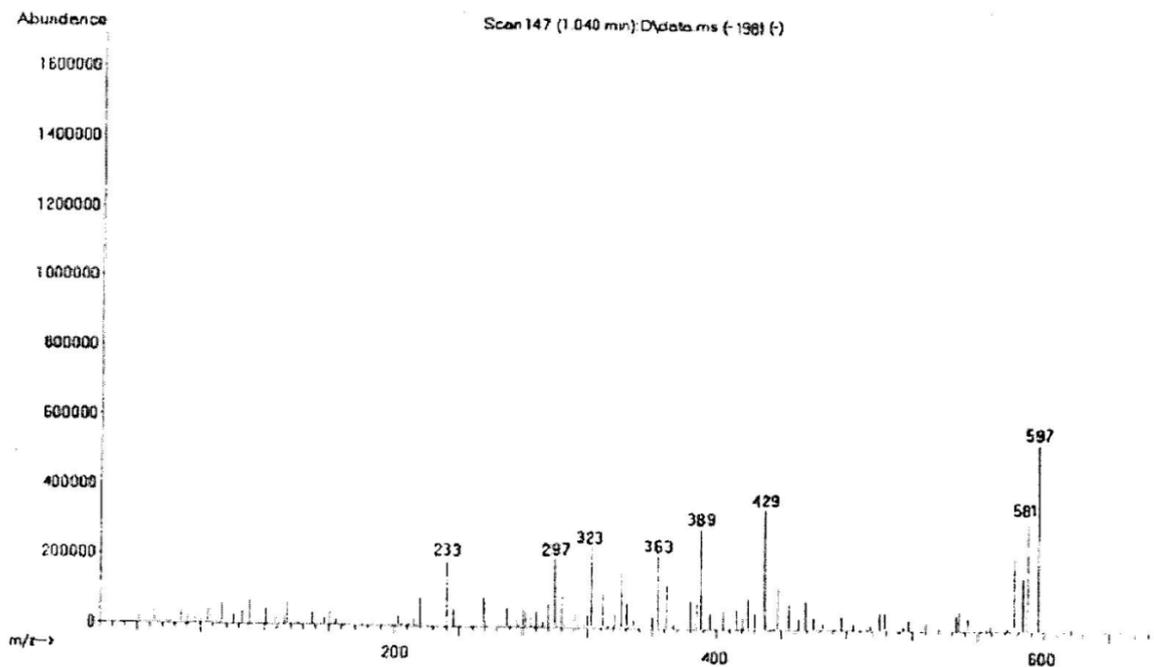


Рисунок 4.9 – Масс-спектр образца астаксантина

В результате анализа трех лабораторных серий каждого из каротиноидов были получены сигналы фрагментов молекул, расшифровку которых проводили с

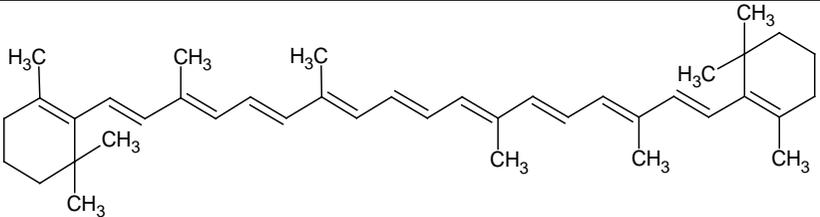
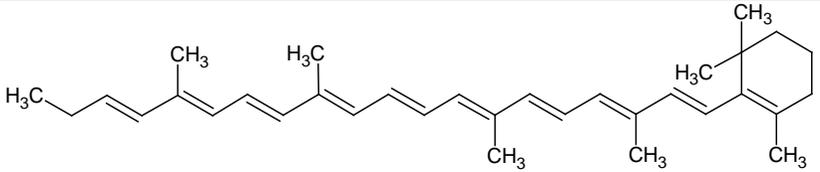
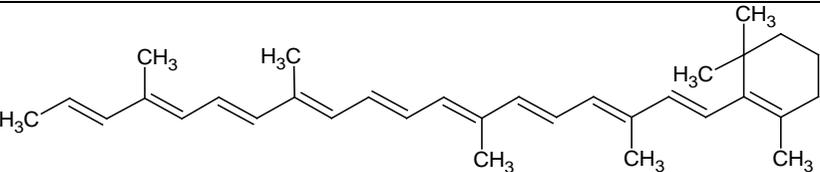
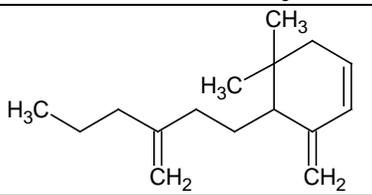
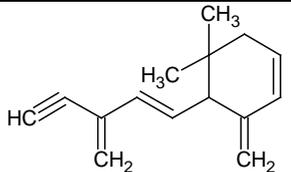
помощью базы данных <http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu> [312] и на основе литературных данных [116, 310, 311].

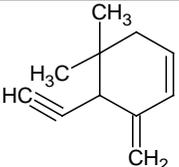
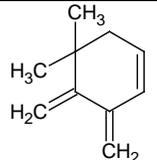
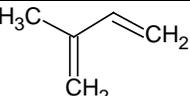
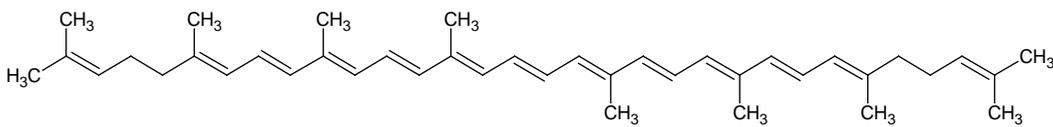
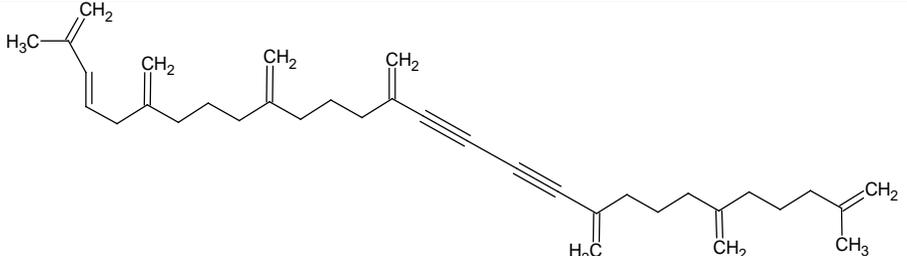
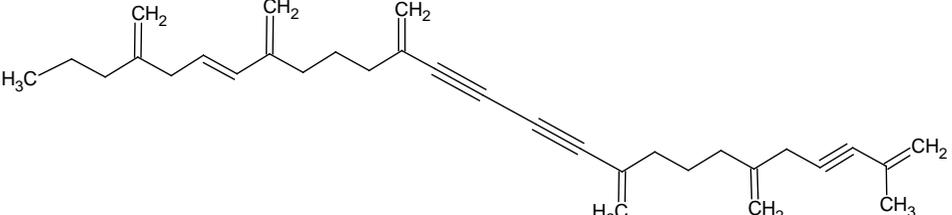
Наиболее характерные сигналы молекулярных фрагментов, полученных в ходе эксперимента, а также расчетным способом и из данных литературы, представлены в таблице 4.2.

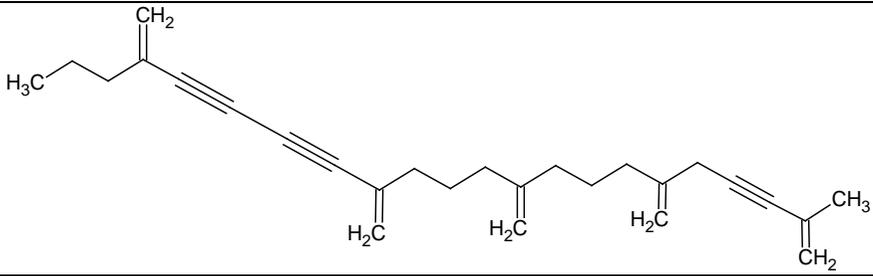
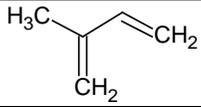
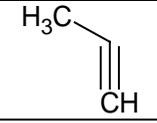
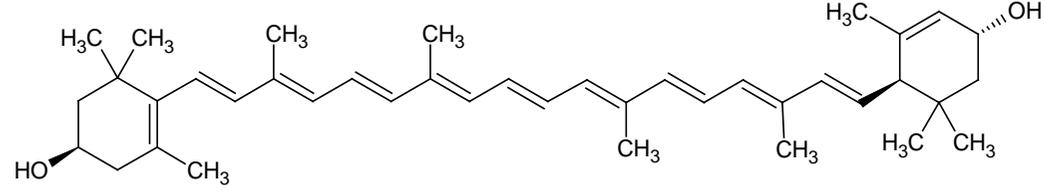
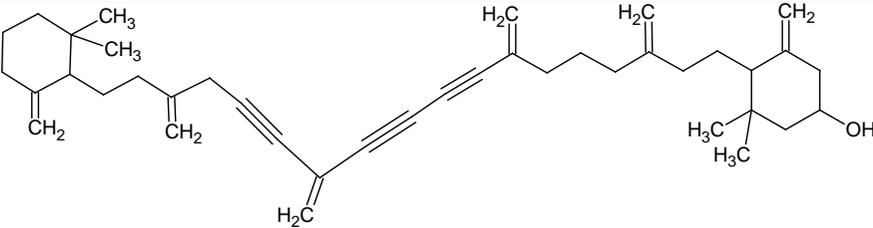
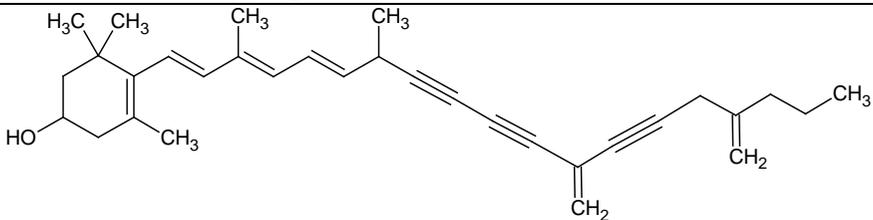
Одной из трудностей при анализе каротиноидов методом масс-спектрометрии является фрагментация полиеновой цепи, что проявляется в значительном количестве сигналов с молекулярными массами менее 200. Определить происхождение этих «осколков» трудно, поскольку многие из них образуются в результате многоступенчатых «расколов» молекул разных соединений. Решить эту задачу можно, если среди общих фрагментов с низкими значениями масс отобрать несколько специфичных сигналов, обеспечивающих идентификацию.

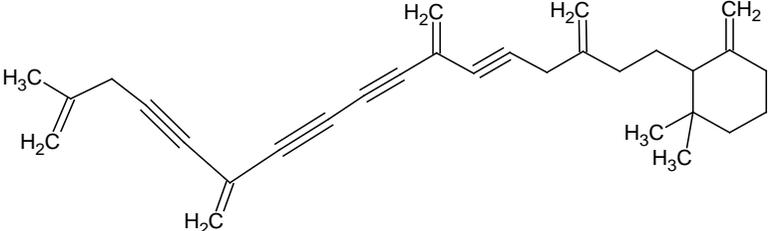
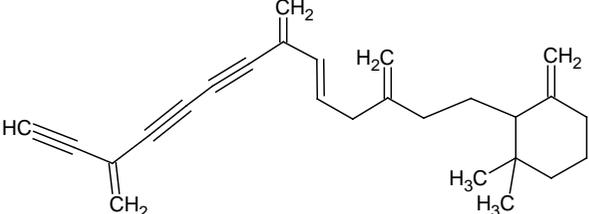
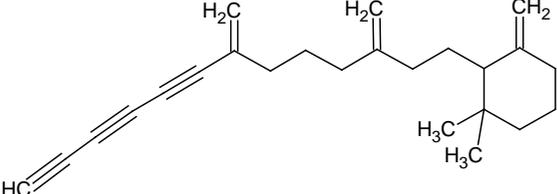
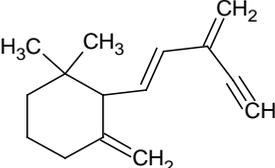
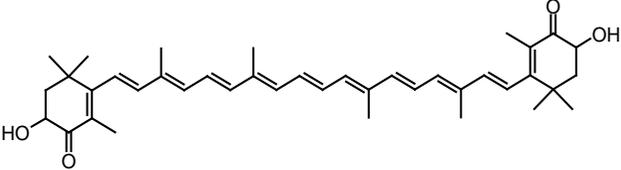
С этой целью нами был применен сложный многоступенчатый анализ полученных сигналов.

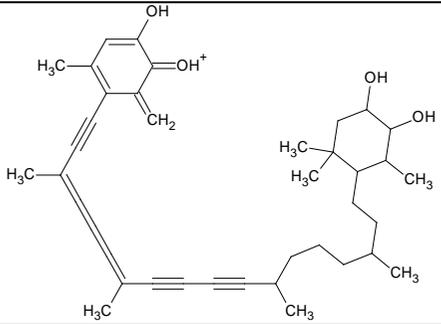
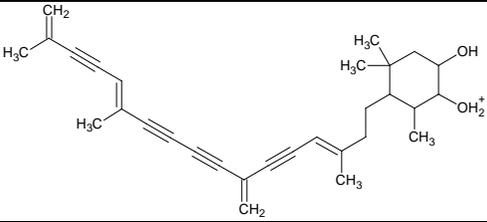
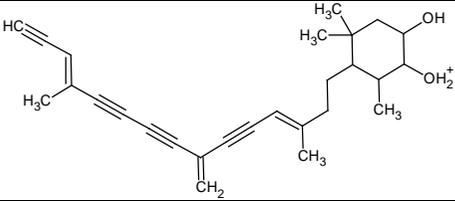
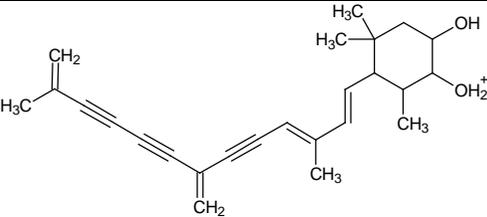
Таблица 4.2 – Результаты анализа субстанций β -каротина, ликопина, лютеина, астаксантина методом масс-спектрометрии

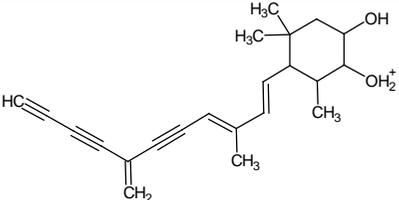
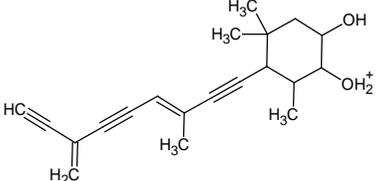
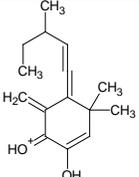
Каротиноиды и фрагмент их структур	Данные литературы, m/z [118, 287, 292]	Расчетное значение, m/z [M+H] ⁺ [291]	Экспериментальное значение, m/z
1	2	3	4
 <p style="text-align: center;">β-каротин</p>	536	536	536,872
	444	443,37	444,012
	430	429,35	430,047
	219	219,21	219,181
	197	199,15	198,165

1	2	3	4
	145	147,11	147,242
	133	135,11	135,136
	69	69,07	69,082
 <p style="text-align: center;">Ликопин</p>	536	537,44	537,422
	467	469,38	467,201
	430	425,32	427,334

1	2	3	4
	361	359,27	360,450
	69	69,07	69,038
	41	41,04	41,023
 <p data-bbox="651 911 763 938">ЛЮТЕИН</p>	569	569,44	569,115
	550	551,42	550,416
	441	441,32	441,288

1	2	3	4
	392	395,27	394,256
	338	343,24	340,177
	324	319,24	321,342
	203	201,16	202,896
 <p data-bbox="622 1252 795 1276">астаксантин</p>	596	597	597,373

1	2	3	4
	581	581	581,365
	429	429	429,277
	389	389	389,054
	363	364	363,639

1	2	3	4
	323	323	323,205
	297	298	297,894
	233	234	233,121

Например, и для β -каротина, и для ликопина, являющихся структурными изомерами, был определен молекулярный ион 69. По данным литературы [312, 313] такой «осколок» должен отсутствовать в масс-спектрах их изомеров α - и γ -каротинов. Вместе с тем фрагментация иона 69 с образованием «осколка» 41 характерна только для ликопина. В связи с этим наличие молекулярного иона 41 может быть маркерным для ликопина.

Более важной и показательной является область молекулярных масс более 300, в которой можно выделить фрагменты, характерные и для концевых групп, и для полиеновой цепи.

Например, при отщеплении у β -каротина молекулярного иона с массой 92 образуется фрагмент $[M+H-92] - 444$, что характерно и для α -каротина, γ -каротина. Однако по данным литературы [312, 313] для изомеров β -каротина: α -каротина, γ -каротина и ликопина присуще образование иона $[M+H-69] - 467$, что не свойственно для β -каротина. Поэтому отсутствие этого «осколка» в масс-спектре образца β -каротина дополнительно подтверждает подлинность это каротиноида, а наличие иона $[M+H-69] - 467$ в масс-спектре образца ликопина – его подлинность.

Для лютеина потеря концевой фрагмента приводит к образованию иона 441. Следует отметить, что, по литературным данным, такой фрагмент не образует его изомер – зеаксантин [312-314]. В масс-спектре лютеина вторая по интенсивности полоса относится к молекулярному иону $[M+H] - 569$. В таких же пределах образуется и «осколок» $[M+H-18] - 551$, что не характерно для зеаксантина [314]. Такая особенность объясняется разницей положения гидроксигруппы в этих соединениях: потеря гидроксигруппы протекает легче для аллильного положения в ϵ -кольце лютеина, чем для неаллильной гидроксильной группы, расположенной в β -кольце зеаксантина [312]. Также для лютеина является показательным образование каскада «осколков» в интервале 392 – 324 в результате дефрагментации углеродной цепи. Подобного процесса не происходит [311-314] со структурой зеаксантина. Таким образом, испытуемый образец идентифицирован как лютеин.

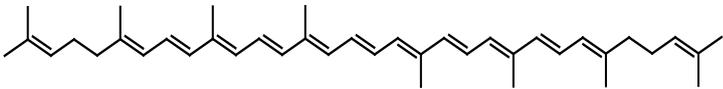
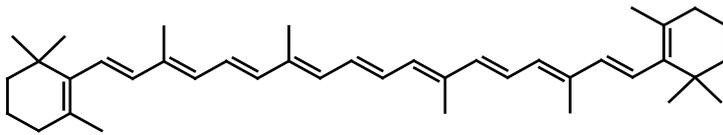
Основная полоса в масс-спектре астаксантина – 597 [M+H], вторая обусловлена присутствием иона [M+H-168] – 429, который образуется при потере астаксантином одного из концевых фрагментов. На этом же уровне находится полоса «осколка» [M+H-18] – 581. «Каскад осколков» в интервале 389 – 297 возникает в результате циклического отщепления фрагментов C₃H₄ и C₂H₂ [312], что можно признать характерным для астаксантина.

Таким образом, методом масс-спектрометрии подтверждена подлинность и структуры каротиноидов, полученных по предложенной унифицированной технологии (Глава 3).

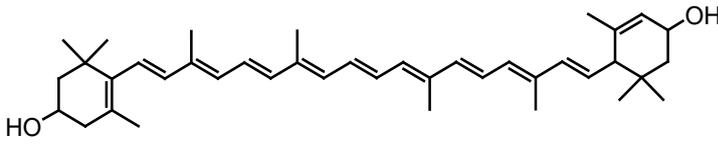
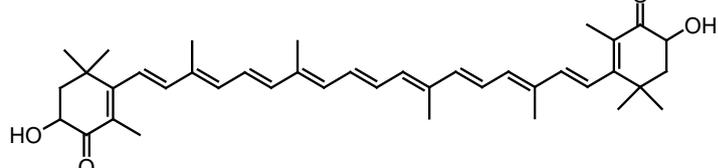
4.3 Идентификация каротиноидов методом ИК-спектроскопии

Для регистрации ИК-спектров готовили образцы по методике [117]. Характеристические полосы поглощения в интервале 4000 – 400 см⁻¹ полученных субстанций каротиноидов представлены в сводной таблице 4.3, а сами ИК-спектры исследованных субстанций приведены на рисунках 4.10 – 4.13.

Таблица 4.3 – Характеристические полосы поглощения полученных каротиноидов

Название и формула каротиноида	Полосы поглощения, см ⁻¹	Данные литературы, см ⁻¹ [55, 116, 131]
1	2	3
 Ликопин	3026, 2958, 2902, 2859, 1454 (CH ₃ , CH) 1628, 1562, 826 (C=C) 960 (CH=CH – <i>транс</i> -изомер)	2950 – 2850, 1465 (CH ₃ , CH) 1629, 1560 (C=C) 960 (CH=CH <i>транс</i> -изомер)
 β-Каротин	3020, 2950, 2910, 2852, 1450 (CH ₃ , CH) 1625, 1560, 830 (C=C) 966 (CH=CH – <i>транс</i> -изомер)	2950 – 2850, 1465 (CH ₃ , CH) 1622, 1561 (C=C) 960 (CH=CH <i>транс</i> -изомер)

Продолжение таблицы 4.3

1	2	3
 <p style="text-align: center;">Лютеин</p>	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)	3300 – 3400 (-OH) 1040 (C-O) 2950 – 2850, 1465 (CH ₃ , CH) 1628, 1562 (C=C)
 <p style="text-align: center;">Астаксантин</p>	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)	3489 (OH) 1653 (C=O) 2950 – 2850, 1460 (CH ₃ , CH) 1568 (C=C)

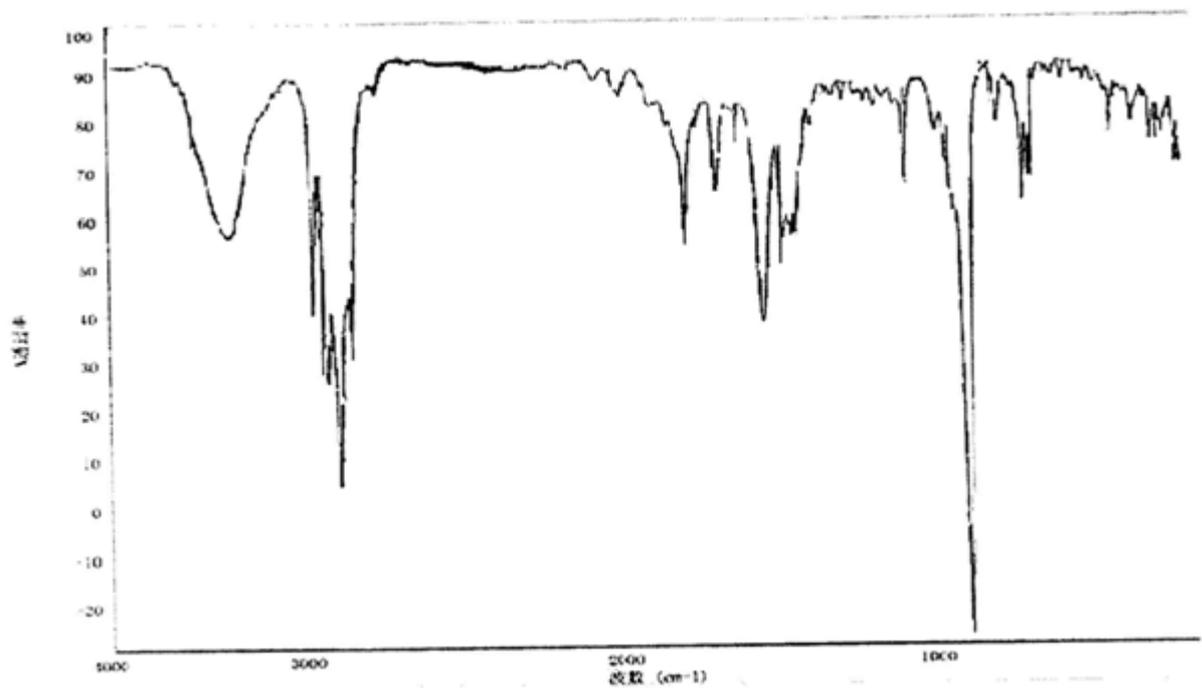


Рисунок 4.10 – ИК-спектр субстанции ликопина (в дисках калия бромида)

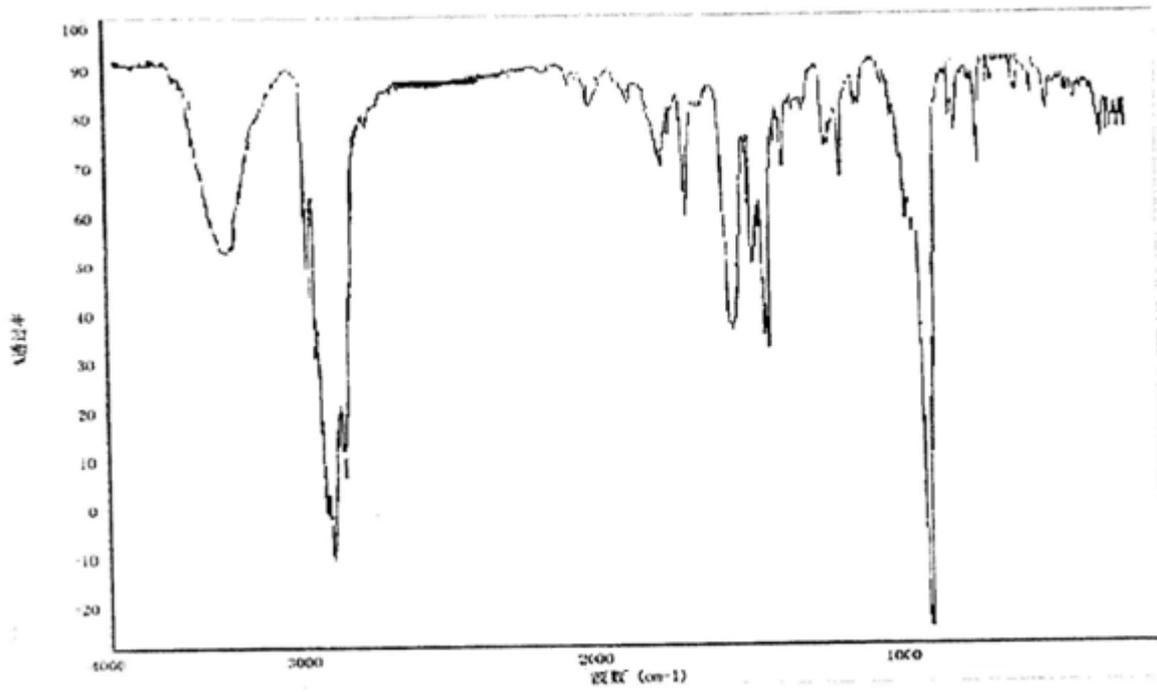


Рисунок 4.11– ИК-спектр субстанции β -каротина (в дисках калия бромида)

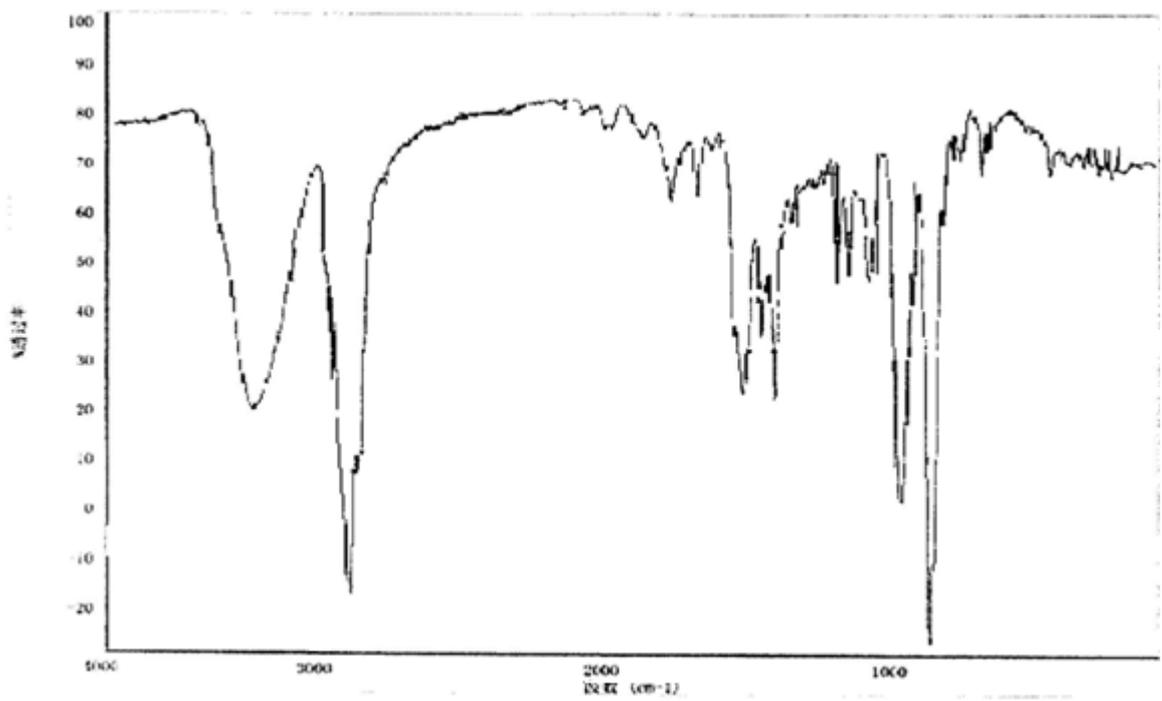


Рисунок 4.12 – ИК-спектр субстанции лютеина (в дисках калия бромида)

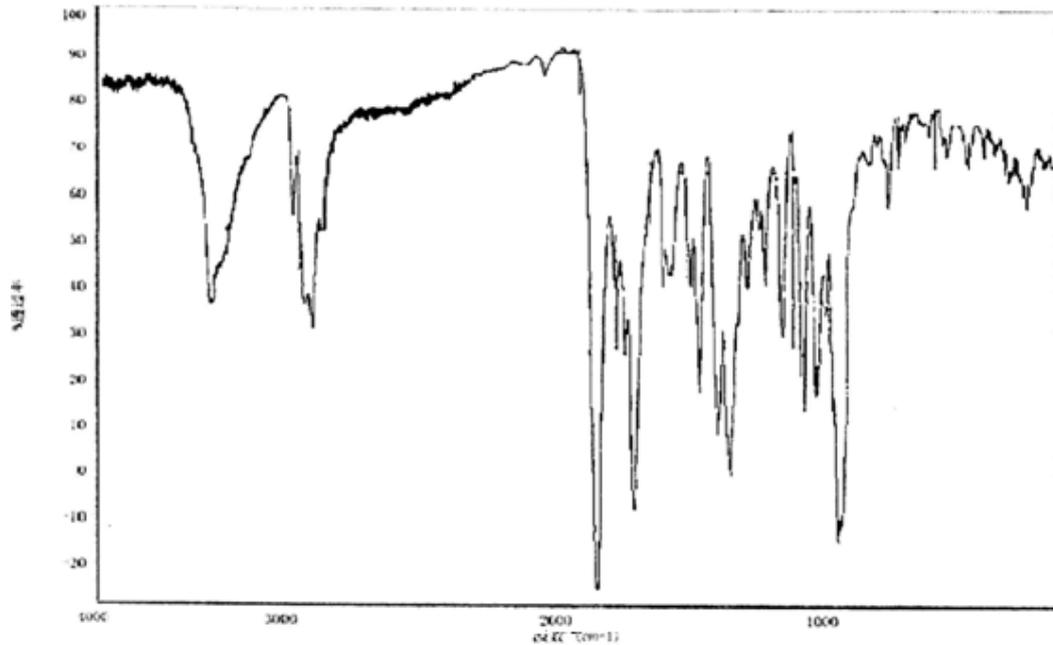


Рисунок 4.13 – ИК-спектр субстанции астаксантина (в дисках калия бромиде)

При идентификации каротиноидов, прежде всего, следует акцентировать внимание на основных характеристических полосах поглощения в интервалах $1300\text{-}850\text{ см}^{-1}$ и $3000\text{-}2800\text{ см}^{-1}$ [315, 316].

К таковым относят сильные валентные колебания CH_3 -, CH -групп при $2950\text{-}2850\text{ см}^{-1}$ и их более слабые деформационные колебания при 1465 см^{-1} и 1380 см^{-1} [316].

Анализ полученных нами соединений показал, что в спектрах всех образцов присутствуют полосы, обусловленные наличием полиеновой цепи, например, для ликопина – $3026, 2958, 2902, 2950\text{ см}^{-1}$. Эта группа полос проявляется и в спектрах каротинов, и в спектрах ксантофиллов, что соответствует данным литературы [55, 117, 131] (Таблица 4.3).

Для спектров четырех полученных субстанций характерно наличие выраженной полосы при 960 см^{-1} и слабой полосы в интервале от 825 до 830 см^{-1} , которые свидетельствуют о том, что нами преимущественно получены каротиноиды в *транс*-форме, что подтверждается присутствием полосы около 1600 см^{-1} слабой и средней интенсивности и отсутствием поглощения при $800\text{-}750\text{ см}^{-1}$. Отсутствие в спектрах образцов всех полученных субстанций

поглощения при 690 см^{-1} , характерного для спектров *цис*-изомеров, подтверждает получение образцов каротиноидов в *транс*-форме [55, 116, 131].

Согласно источникам [55, 116, 315] прослеживается зависимость между интенсивностью полосы поглощения в области 1600 см^{-1} и симметрией молекулы каротиноида: чем выше симметрия молекулы каротиноида, тем менее интенсивна эта полоса поглощения, при этом наблюдается меньшее число полос в этой области. В подтверждение данных литературы в ИК-спектрах полученных нами образцов наблюдается достаточно слабое поглощение в области 1600 см^{-1} и наличие одной (для ликопина, β -каротина, лютеина) и двух (для астаксантина) полос поглощения в этой области, что говорит в пользу вывода о том, что получены симметричные изомеры (C_{15}, C_{13}). Еще одним фактом, подтверждающим этот вывод, является отсутствие полосы при $1800\text{-}1750\text{ см}^{-1}$, характерной для асимметричных каротиноидов [55, 116, 131].

В ИК-спектрах проанализированных образцов присутствует полоса в области $1625\text{-}1630\text{ см}^{-1}$ ($C=C$), которая характеризуется более низкой интенсивностью по сравнению со спектрами каротиноидов, в молекулах которых нет концевых циклических фрагментов [315, 316]. Это подтверждается экспериментально, в частности, в спектре ликопина эта полоса имеет наибольшую интенсивность, тогда как в спектрах трех других соединений ее интенсивность была гораздо ниже.

В структурах ксантофиллов, помимо полиенового фрагмента, присутствуют кислородсодержащие функциональные группы. Так, для лютеина – гидроксигруппы ($-OH$) проявляются в области 3400 см^{-1} , а для астаксантина, кроме OH -групп, наблюдаются полосы групп $C=O$ и $C-O$ – при 1650 см^{-1} и 1060 см^{-1} [55, 116, 315].

Подлинность полученных лютеина и астаксантина подтвердилась также присутствием в их ИК-спектрах выраженных полос поглощения при 3400 и 3490 см^{-1} (связи $O-H$ для лютеина, астаксантина соответственно), 1048 и 1076 см^{-1} (связи $C-O$ для лютеина, астаксантина соответственно) и 1652 см^{-1} (связи $C=O$ для астаксантина).

Таким образом, ИК-спектры субстанций каротиноидов, полученных по предложенной нами унифицированной технологии, подтверждают их идентичность с β -каротином, ликопином, лютеином и астаксантином.

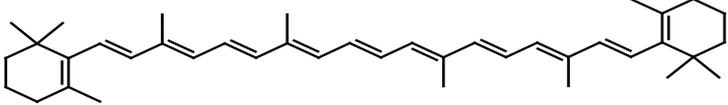
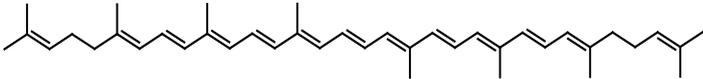
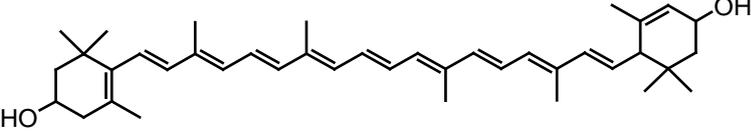
4.4 Анализ субстанций каротиноидов методом УФ-спектрофотометрии

Метод УФ-спектрофотометрии остается одним из самых доступных [317-319] методов анализа БАВ природного происхождения [320-322].

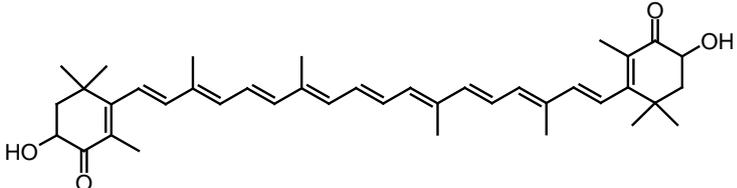
Для регистрации электронных спектров в интервале длин волн от 300 до 700 нм готовили растворы полученных субстанций β -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина с концентрацией около $2 \cdot 10^{-6}$ г/мл ($2 \cdot 10^{-4}$ %) в н-гексане, петролейном эфире, хлороформе, ацетоне, спирте этиловом 95 %.

Данные литературы о положениях максимумов поглощения растворов изучаемых каротиноидов представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Максимумы поглощения некоторых каротиноидов

Название и формула каротиноида	Данные литературы, нм [55, 116, 131]	Максимумы поглощения, нм
1	2	3
 β -Каротин	425, 450, 477 (н-гексан) 435, 461, 485 (хлороформ) 429, 452, 478 (ацетон)	426, 448, 476 (н-гексане) 434, 461, 484 (хлороформ) 430, 454, 479 (ацетон)
 Ликопин	444, 470, 502 (н-гексан) 458, 484, 518 (хлороформ); 448, 474, 505 (ацетон)	442, 470, 504 (н-гексан) 458, 486, 517 (хлороформ); 446, 472, 505 (ацетон);
 Лютеин	421, 445, 474 (н-гексан) 435, 458, 485 (хлороформ) 422, 445, 474 (спирт этиловый 95 %)	419, 445, 472 (н-гексан) 436, 460, 483 (хлороформ) 423, 444, 474 (спирт этиловый 95 %)

Продолжение таблицы 4.4

1	2	3
 <p style="text-align: center;">Астаксантин</p>	468 (н-гексан) 485 (хлороформ) 480 (ацетон)	468 (н-гексан) 487 (хлороформ) 481 (ацетон)

Растворы образцов β -каротина в н-гексане и ацетоне имеют следующие максимумы поглощения: 426, 448, 476 нм и 430, 454, 479 нм соответственно. Для раствора β -каротина в хлороформе характерно наличие трех максимумов при 434, 461, 484 нм. Эти результаты коррелируют с теоретическими данными [55, 116, 131].

В спектрах поглощения растворов ликопина в н-гексане, хлороформе, ацетоне проявляются следующие максимумы оптической плотности: 442, 470, 504 нм (н-гексан); 458, 486, 517 нм (хлороформ); 446, 472, 505 нм (ацетон), что соотносится с литературными данными [55, 116, 131].

Образец лютеина при растворении в н-гексане характеризуется тремя максимумами при 419, 445, 472 нм, а в хлороформе – 436, 460, 483 нм. Для спиртового раствора лютеина зафиксированы максимумы поглощения при 423, 444, 474 нм. Результаты анализа во всех трех растворителях соответствуют литературным данным [55, 116, 131].

В спектре раствора астаксантина в хлороформе зафиксирована полоса поглощения с максимумом при 487 нм, в ацетоне – 481 нм, в н-гексане – 468 нм, что согласуется с данными [55, 116, 131].

Таким образом, сравнительный анализ данных таблицы 4.4 позволяет заключить, что в эксперименте нами получены субстанции β -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина. Очевидно, что спектрофотометрия не является высокоспецифичным методом установления подлинности, особенно в сравнении с ЯМР и масс-спектроскопией. При этом именно спектрофотометрия является максимально доступным методом анализа каротиноидов для всех исследователей,

поэтому мы предлагаем повысить ее специфичность, регистрируя спектры поглощения образцов каротиноидов ни в одном, а, например, в трех растворителях с различной полярностью.

Кроме того, как известно, использование в работе СО каротиноидов значительно увеличит достоверно результатов эксперимента, при этом будет достаточным измерение спектра поглощения образца каротиноида только в одном из приемлемых для него растворителей.

Иногда для доказательства подлинности и чистоты каротиноидов, имеющих три максимума поглощения в электронном спектре, используют отношение интенсивности поглощения третьего максимума ко второму (III/II) в процентах. За базовую принимают линию, проходящую через минимум поглощения между максимумом II и максимумом III [55, 116, 131, 300].

Экспериментально найденные значения отношения (III/II) для изучаемых образцов и данные литературы представлены в таблице 4.5.

Таблица 4.5 – Табличные и расчетные значения отношения III/II

Каротиноид	Данные литературы (III/II), % [55, 116, 131, 249]	Данные для расчета			Расчетное значение (III/II), %
		A_{III}	A_{II}	A_{min}	
β -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

Полученные данные являются дополнительным подтверждением подлинности и чистоты субстанций каротиноидов, полученных по предложенной нами унифицированной технологической схеме.

Применив результаты, полученные методами ЯМР-, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии и УФ-спектрофотометрии, можно заключить, что полученные нами субстанции идентифицированы как β -каротин, ликопин, лютеин и астаксантин, кроме того экспериментально обоснована и подтверждена возможность использования этих методов для установления структуры каротиноидов и их идентификации.

4.5 Анализ каротиноидов хроматографическими методами

Постоянное совершенствование аппаратного оснащения и методологии хроматографии позволяет максимально эффективно использовать этот метод в анализе любых природных соединений, в том числе и каротиноидов [323-326]. Полученные нами субстанции β -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина были исследованы методами хроматографии в сравнении с данными литературы [301, 326, 328] и СО каротиноидов.

4.5.1 Установление подлинности субстанций каротиноидов методом тонкослойной хроматографии

В условиях, представленных в главе 2, проведен ТСХ-анализ субстанций каротиноидов. По результатам предварительных исследований выбрано оптимальное количество испытуемых растворов и растворов СО каротиноидов, наносимых на линию старта, – 5 мкл [329]. Примеры объединенных схем хроматограмм, полученных в ПФ I – IV, представлены на рисунках 4.14, 4.15.

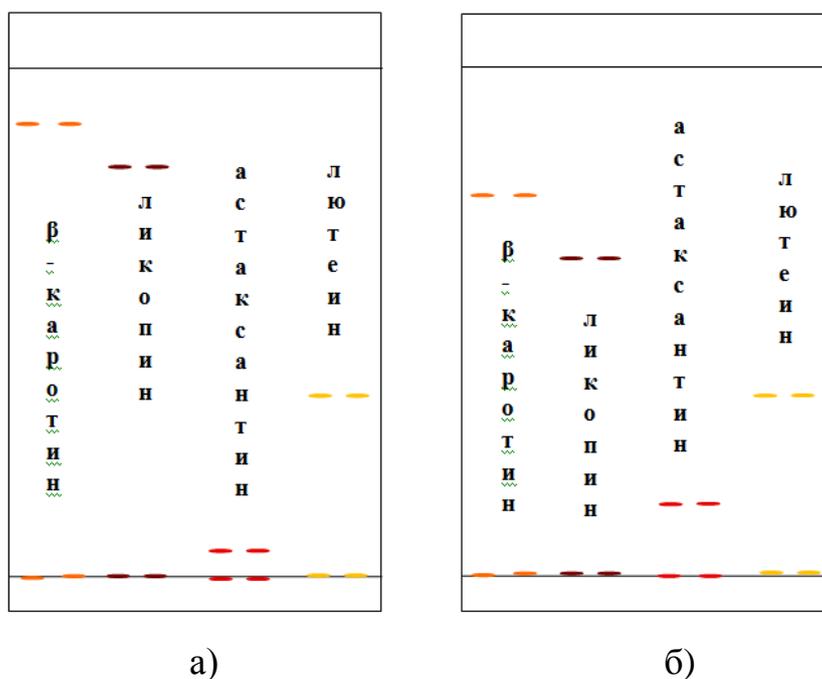


Рисунок 4.14 – Объединенная схема хроматограмм для подвижной фазы I (а) и подвижной фазы II (б)

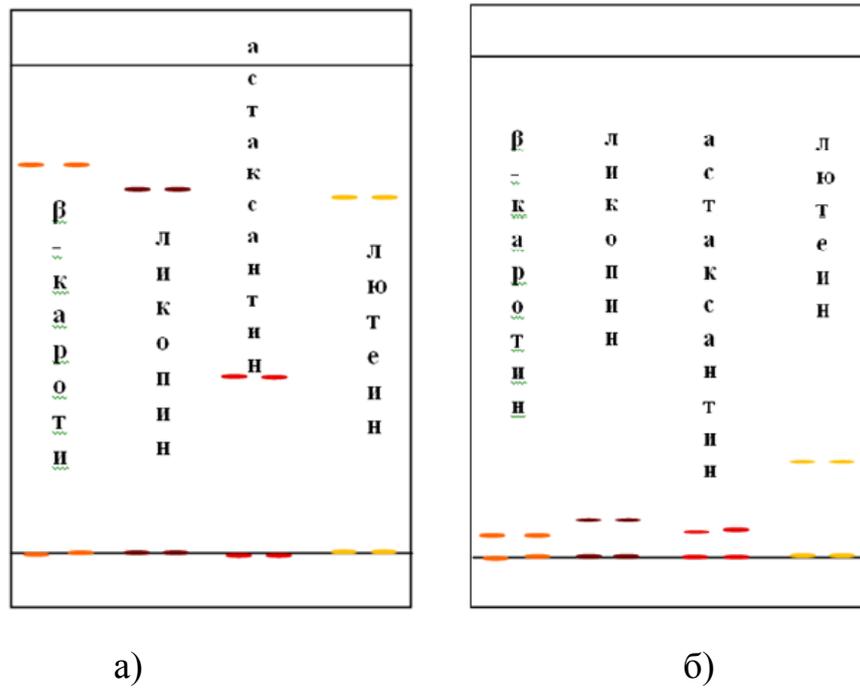


Рисунок 4.15 – Объединенная схема хроматограмм для подвижной фазы III (а) и подвижной фазы IV (б)

Значения фактора удерживания, рассчитанные по результатам проведенного эксперимента, представлены в таблице 4.6.

Таблица 4.6 – Результаты ТСХ-анализа образцов субстанций каротиноидов

Каротиноид	Подвижная фаза/фактор удерживания (R_f^*)			
	I	II	III	IV
β -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 β -каротину, были окрашены в оранжевый цвет, ликопину – оранжево-красный, лютеину – ярко-желтый, астаксантину – ярко-красный. После обработки хроматограмм проявителем и нагревания, все зоны адсорбции проявлялись в виде синих пятен на зелено-желтом фоне.

На всех полученных хроматограммах зоны адсорбций изучаемых субстанций находятся на одном уровне с зонами адсорбции СО соответствующих

каротиноидов. Для каждого экспериментального образца каротиноида рассчитан относительный фактор удерживания, который находился в интервале 0,99 – 1,01.

Эксперимент показывает идентичность полученных нами образцов каротиноидов и СО β-каротина, ликопина, лютеина и астаксантина. Анализ каротиноидов методом ТСХ является более специфичным, чем метод спектрофотометрии, и может использоваться и 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, что представлено в главе 6.

4.5.2 Контроль содержания остаточных растворителей методом газожидкостной хроматографии

Согласно ГФ XIII все фармацевтические субстанции, в технологии получения которых использовались органические растворители, подлежат обязательному контролю на их остаточное содержание [117]. Используемые в процессе получения субстанций каротиноидов спирт этиловый и ацетон в соответствии с классификацией растворителей по степени риска относятся к низкотоксичным растворителям, петролейный эфир – к группе растворителей, для которых недостаточно обоснована токсичность, а хлороформ и н-гексан к 2 классу токсичности и их содержание должно быть не более 0,006 % и 0,029 % соответственно [117]. Таким образом, при разработке методики в соответствии с [117] были установлены предварительные нормы содержания для спирта этилового и ацетона не более 0,5 %, для хлороформа не более 0,006 %, для н-гексана – 0,029 %. Ввиду незначительного содержания и недостаточно обоснованной токсичности содержание примеси петролейного эфира не учитывали.

Для обоснования и нормирования содержания органических растворителей в субстанциях полученных каротиноидов был применен метод ГЖХ. Условия проведения ГЖХ анализа субстанций каротиноидов приведены в главе 2.

Последовательно хроматографировали пустой раствор (blank) и стандартный раствор, получая не менее 6 хроматограмм (Рисунки 4.16, 4.17).

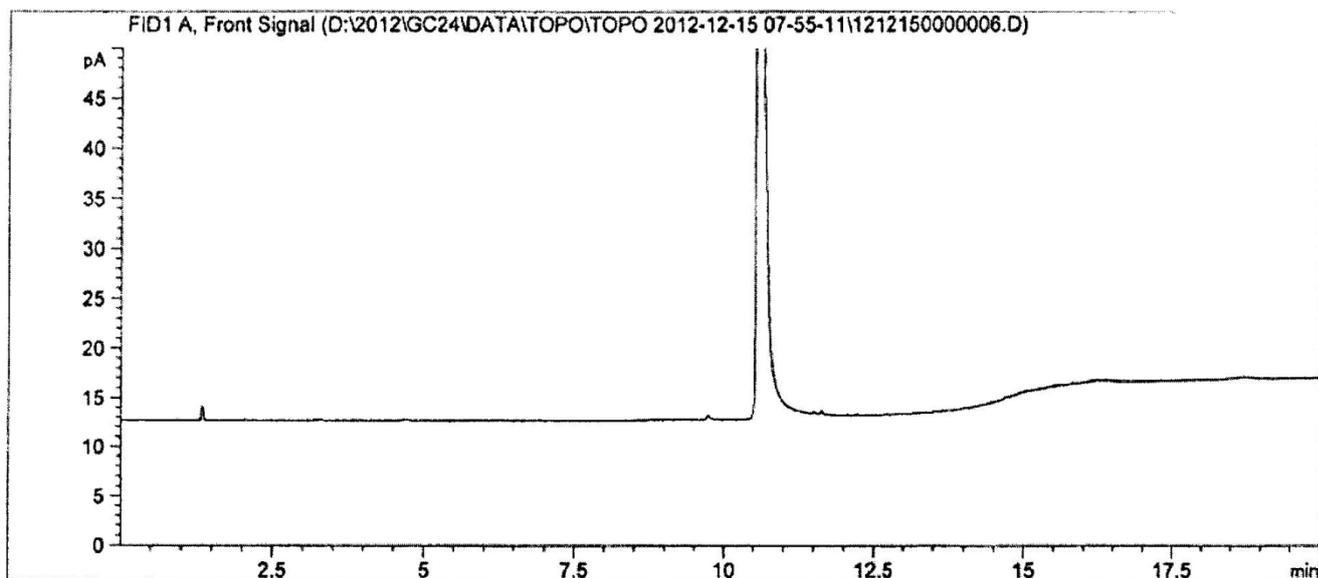


Рисунок 4.16 – Хроматограмма пустого раствора (blank)

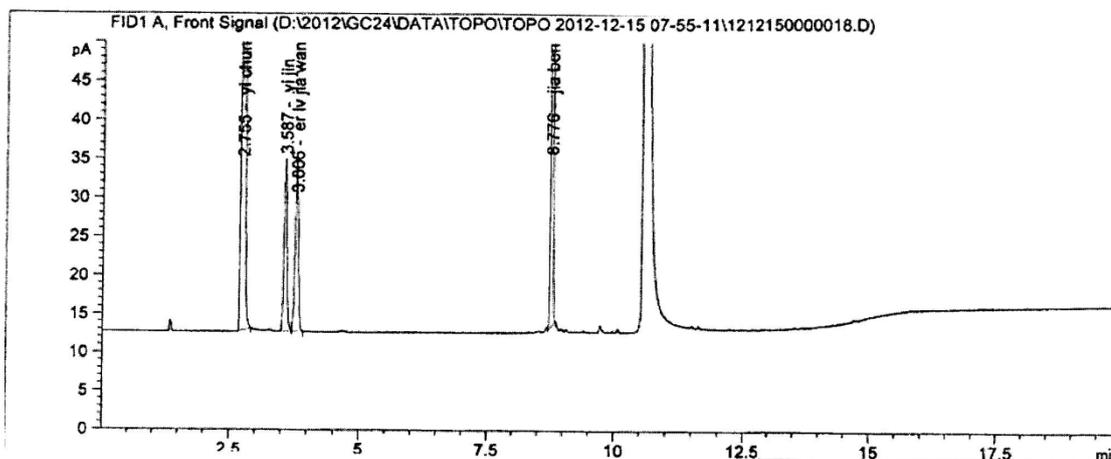


Рисунок 4.17 – Хроматограмма стандартного раствора

Установлен следующий порядок выхода пиков: этанол, ацетон, хлороформ, н-гексан, диметилсульфоксид (Рисунок 4.17).

Хроматографическую систему считали пригодной, т.к. выполнялись следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки для пика каждого органического растворителя составила не менее 5000 теоретических тарелок;

- разрешение (R_s) между соседними пиками органических растворителей не менее 1,5;
- относительное стандартное отклонение площади пика каждого органического растворителя должно быть не более 3 %.

Далее хроматографировали раствор для определения чувствительности (Рисунок 4.18).

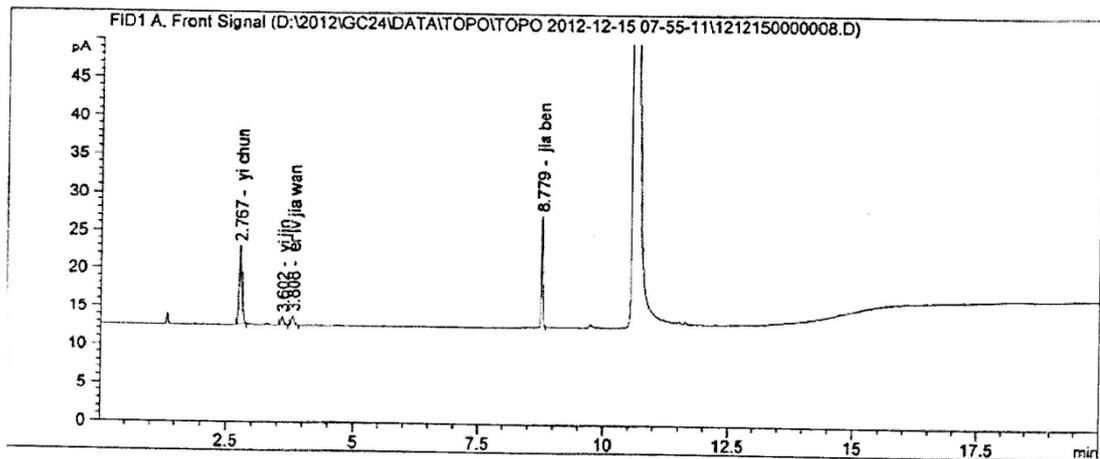


Рисунок 4.18 – Хроматограмма раствора для определения чувствительности

Установлено, что отношение сигнал-шум для пика каждого органического растворителя – не менее 10.

Далее исследовали испытуемый и стандартный раствор.

Примеры типичных хроматограмм для субстанций β -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина представлены на рисунках 4.19 – 4.22.

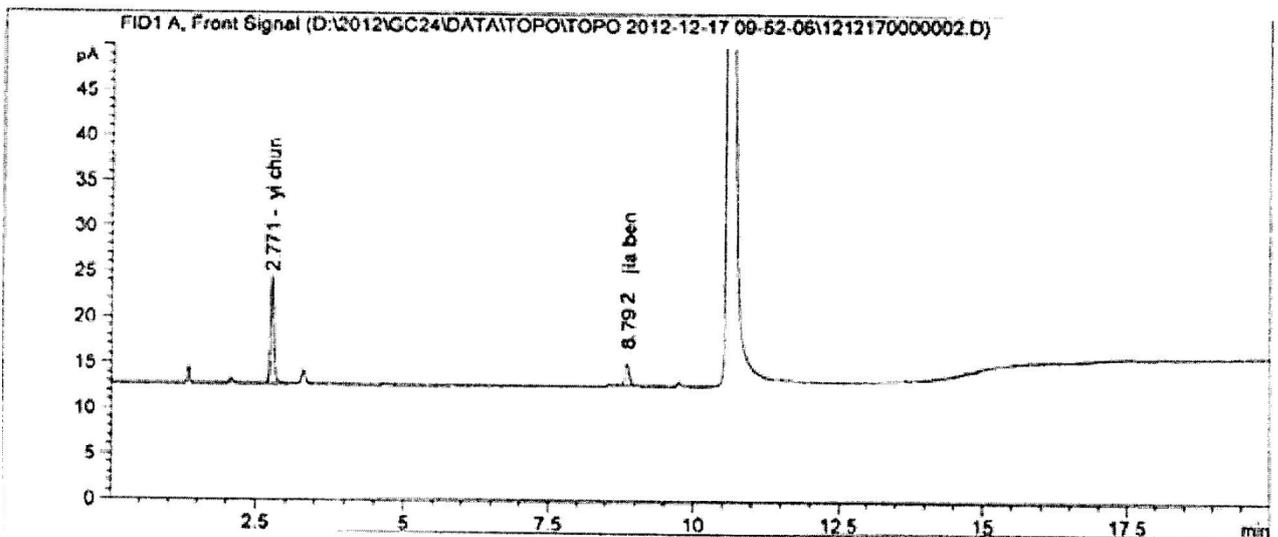


Рисунок 4.19 – Хроматограмма раствора субстанции β -каротина

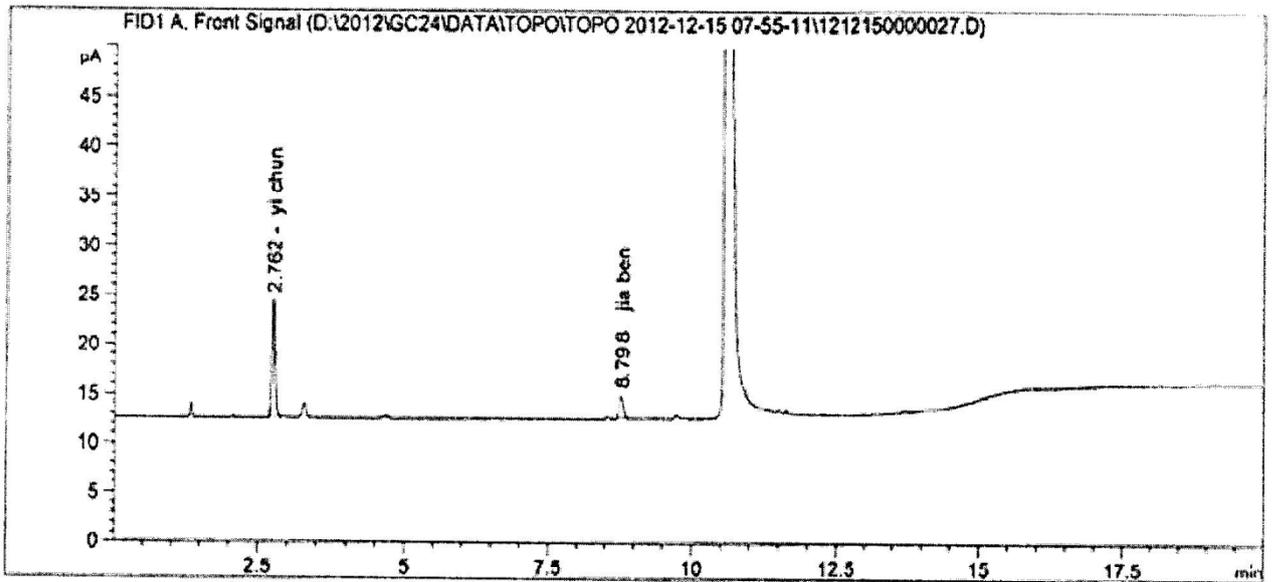


Рисунок 4.20 – Хроматограмма раствора субстанции ликопина

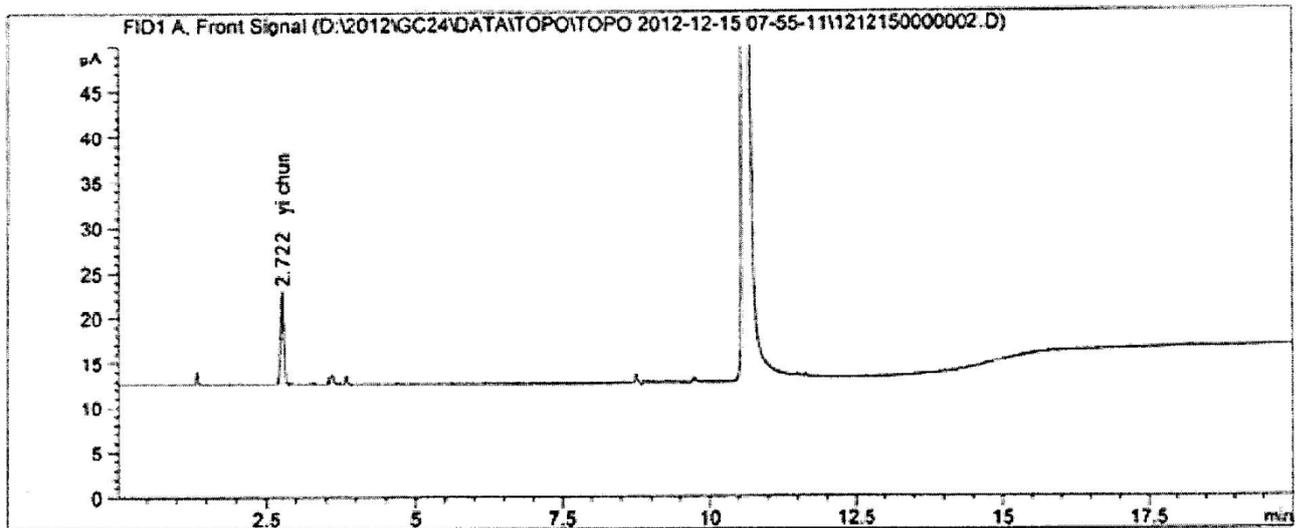


Рисунок 4.21 – Хроматограмма раствора субстанции лютеина

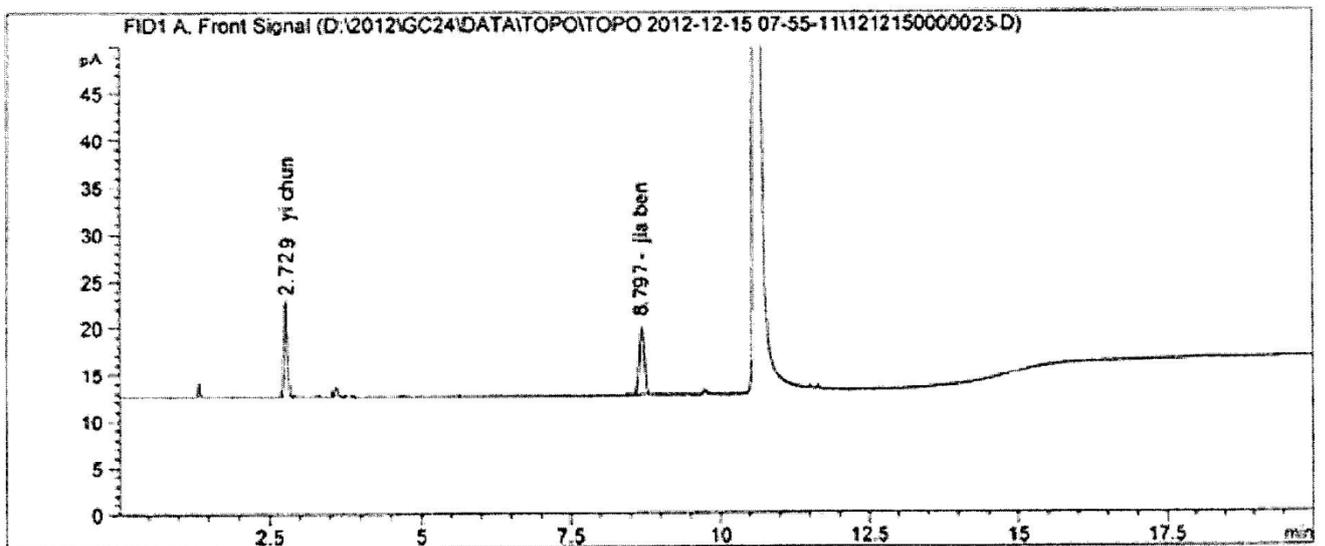


Рисунок 4.22 – Хроматограмма раствора субстанции астаксантина

По результатам анализа субстанций β -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина на содержание остаточных количеств спирта этилового 95 %, ацетона, хлороформа и н-гексана установлено, что оно составило менее 0,5 % (Таблица 4.7).

Таблица 4.7 Содержание остаточных органических растворителей в полученных субстанциях каротиноидов*

Растворитель, %	β -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 ($p=0,95$).

Содержание всех четырех органических растворителей, использованных при получении субстанций каротиноидов, не превысило допустимую норму [117], что подтверждает высокую степень чистоты готового продукта и адекватность предложенной технологии получения.

С учетом полученных результатов по каждому растворителю (менее 0,5 %) для контроля субстанций каротиноидов в качестве альтернативного может использоваться метод высушивания [117].

4.5.3 Анализ каротиноидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографией

ВЭЖХ является одним из наиболее перспективных методов в анализе веществ, особенно при определении чистоты, так как позволяет совместить стадии быстрого, высокоэффективного разделения и высокочувствительного определения. Особенно интересным в анализе каротиноидов является использование фотодиодной матрицы, позволяющей получать спектры широкого

диапазона разделенных компонентов смеси. Используя ранее приведенные данные по соотношению оптических плотностей в максимумах (Ш/П, %) (Глава 4), можно проводить идентификацию каротиноидов с высокой точностью без использования стандартных веществ [265].

Нами проведены исследования по определению чистоты полученных каротиноидов. Результат показан на примере образца ликопина, полученного из плодов томата, анализ проведен по разработанной методике и в условиях, описанных в главе 2.

Хроматографировали раствор для проверки пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, так как выполнялись следующие условия:

- фактор асимметрии пиков (Т) на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы образца не более 1,5;
- разрешение (R) между пиками на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы не менее 1,5 (Рисунок 4.23).

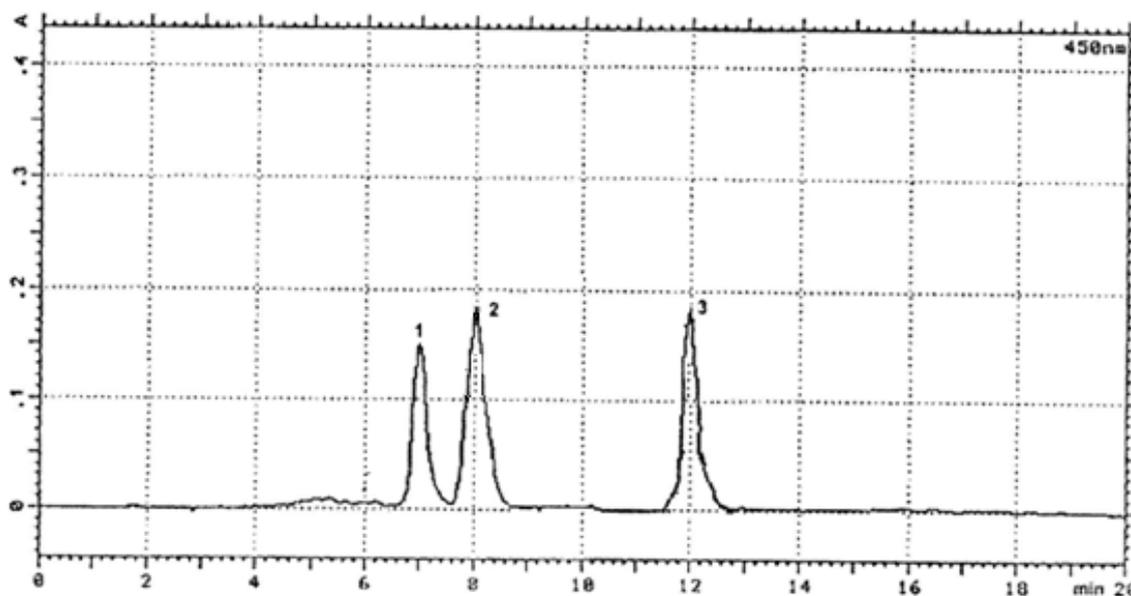


Рисунок 4.23 – Хроматограмма раствора для проверки хроматографической системы:

1-лютеин, 2-ликопин, 3-β-каротин

Далее хроматографировали раствор первичного экстракта (сырье – плоды томата), экстракт до очистки методом КХ и раствор полученной субстанции ликопина (Рисунки 4.24 – 4.26).

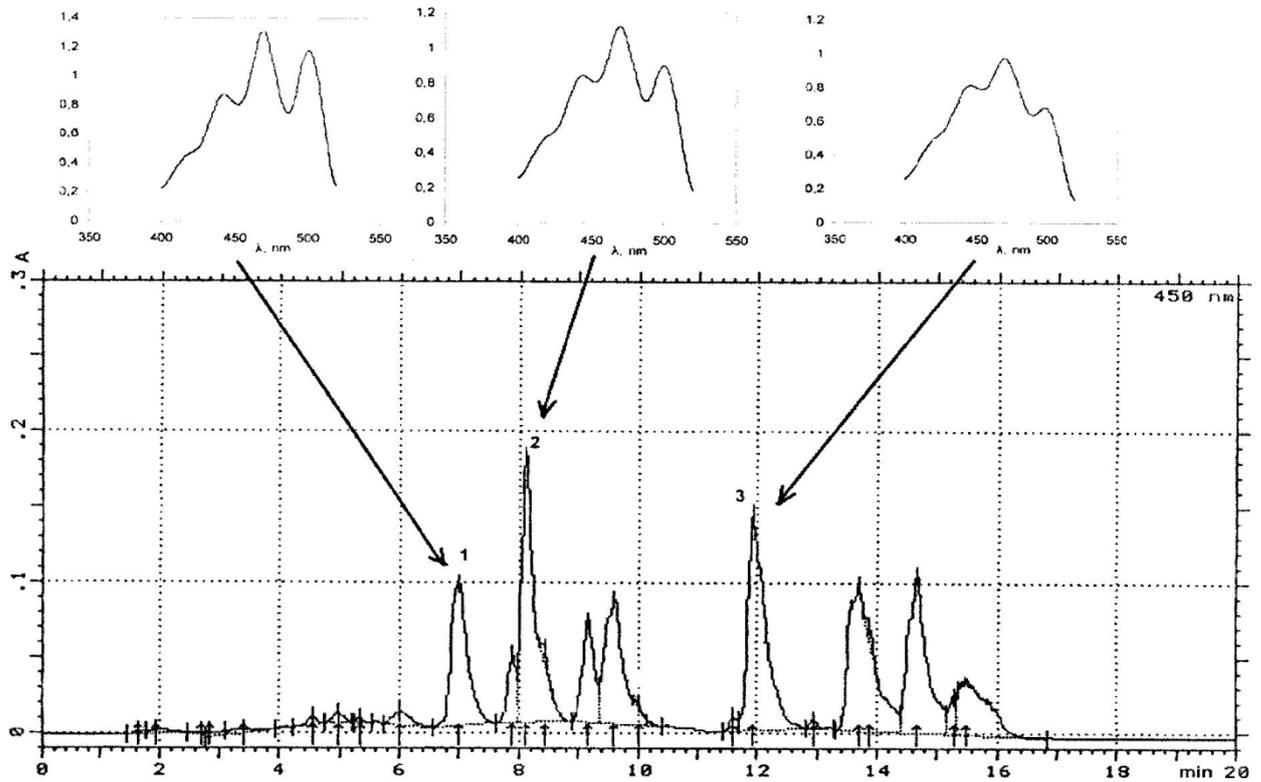


Рисунок 4.24 – Хроматограмма первичного экстракта:

1-лютеин, 2-ликопин, 3-β-каротин

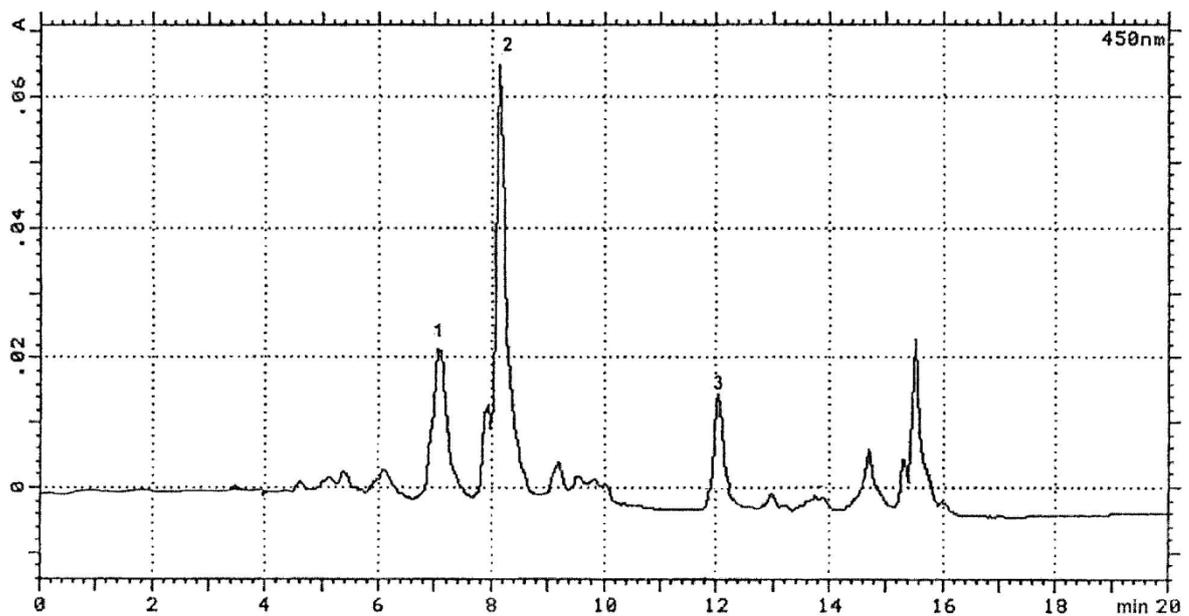


Рисунок 4.25 – Хроматограмма экстракта до КХ:

1-лютеин, 2-ликопин, 3-β-каротин

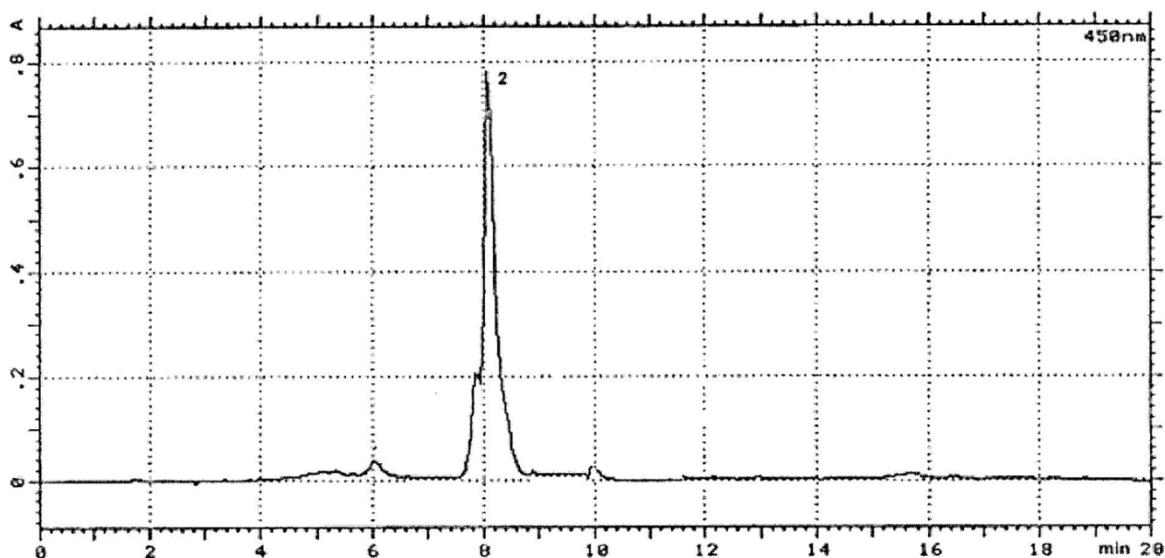


Рисунок 4.26 – Хроматограмма полученной субстанции ликопина, по предлагаемой методике, чистота 99,7 %

Аналогичные исследования были проведены для всех выбранных видов сырья, и были получены удовлетворительные результаты. Таким образом, по предложенной нами унифицированной технологической схеме можно получить субстанции каротиноидов со степенью чистоты, превышающей 99 %. Кроме применения ВЭЖХ, для установления подлинности, чистоты и количественного определения имеется дополнительное направление его использования – это определение перспективных видов лекарственного растительного сырья, содержащих каротиноиды. Необходимо отметить, что, используя предложенные хроматографические условия и подход, можно проводить предварительный анализ сырья без использования дорогостоящих СО каротиноидов.

4.6 Количественное определение каротиноидов в субстанциях

Оптимальными для количественного определения каротиноидов в субстанциях с практической точки зрения являются методы УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ.

Для анализа методом УФ-спектрофотометрии готовили растворы субстанций полученных каротиноидов с концентрацией около $2 \cdot 10^{-6}$ г/мл

($2 \cdot 10^{-4}$ %) в н-гексане путем точного разведения. Для анализа методом ВЭЖХ была использована методика, приведенная выше в главе 2.

Проведено определение количественного содержания ликопина, β -каротина, лютеина, астаксантина в полученных субстанциях, что представлено в таблице 4.8.

Таблица 4.8 –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

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

Результаты определения количественного содержания активного вещества в полученных субстанциях методом ВЭЖХ коррелирует с данными определения этого же показателя методом спектрофотометрии.

Таким образом, экспериментальные данные по количественному анализу субстанций на содержание каротиноидов свидетельствуют о том, что получены субстанции β -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина с содержанием активного вещества не менее 99,0%.

4.7 Обобщенный подход к анализу каротиноидов

Обобщая полученный экспериментальный материал по анализу субстанций каротиноидов, а также данные литературы [55, 116, 300, 301], мы предлагаем схему аналитического сопровождения получения и изучения каротиноидов на примере β -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина (Рисунок 4.27).

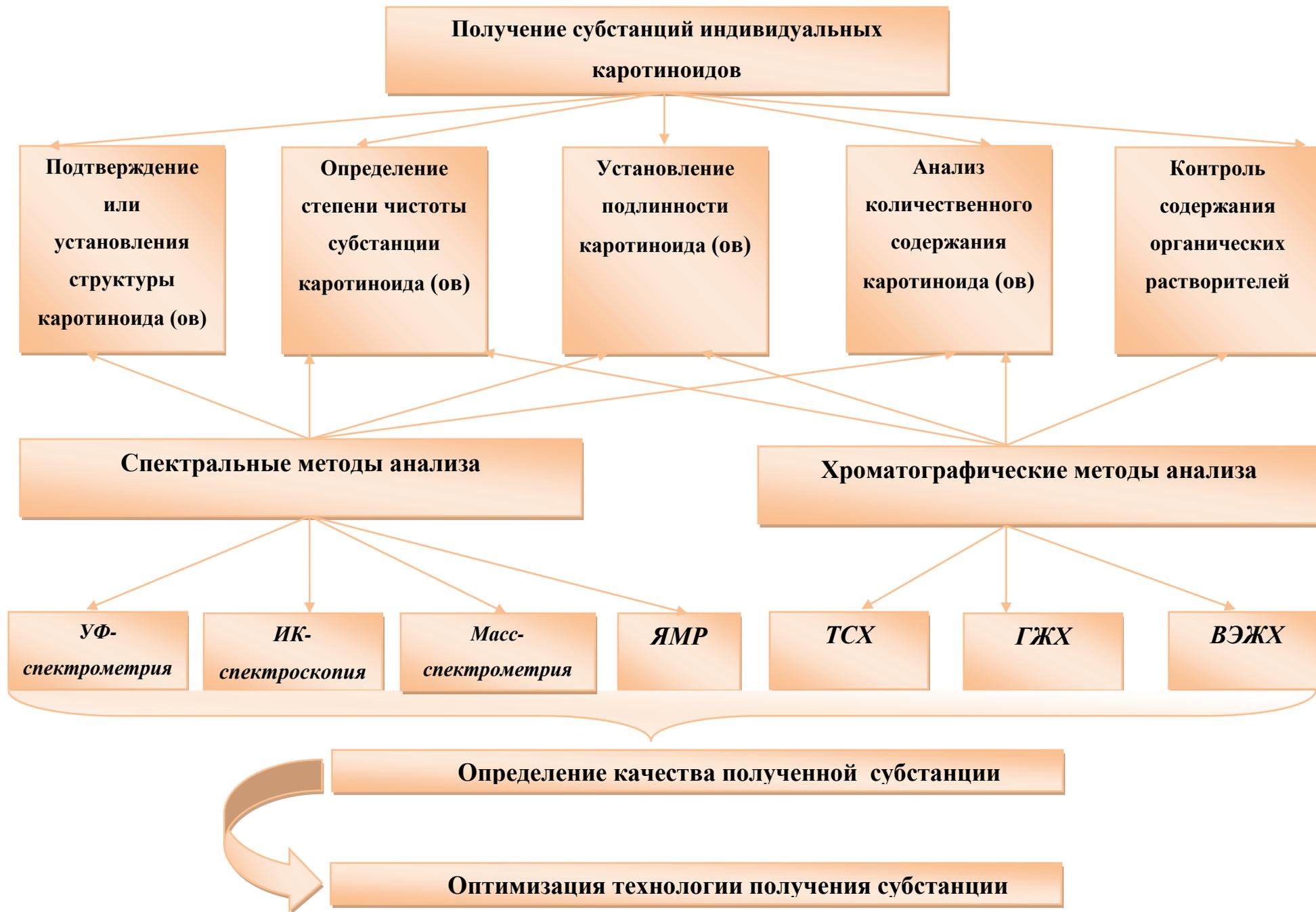


Рисунок 4.27 – Методология аналитического сопровождения изучения и технологии получения субстанций каротиноидов

Приоритетными методами подтверждения структуры выделенных каротиноидов можно считать, прежде всего, ЯМР и масс-спектрометрию. Метод ЯМР, кроме установления структуры каротиноида, позволяет сделать вывод о его геометрической конфигурации. Каротиноиды характеризуются значительной внутриклассовой изомерией, в связи с этим исследователь должен обладать максимально полной информацией о геометрии полученного каротиноида, чтобы в дальнейшем сделать достоверный вывод о связи структура-активность. В настоящее время такие экспериментальные данные можно получить по результатам ЯМР анализа.

Если учитывать обширную внутриклассовую изомерию то, определение только лишь молекулярной массы каротиноида методом масс-спектрометрии для идентификации будет недостаточным, поэтому мы предлагаем применять сравнительный многоступенчатый анализ молекулярных ионов с идентификацией «осколков», характерных для каждого индивидуального каротиноида.

Метод ИК-спектроскопии – это один из специфичных методов подтверждения функциональных групп, а в сочетании с данными ЯМР и масс-спектрометрии и структуры полученного каротиноида. Кроме того, наличие или отсутствие некоторых полос поглощения в интервале от 1000 до 800 см^{-1} , позволяет дополнительно судить о *Z/E*-конфигурации полученного каротиноида.

При проведении предварительных испытаний и в ходе контроля за процессом получения каротиноидов спектрофотометрия является незаменимым методом анализа. Несмотря на его невысокую специфичность, применение спектрофотометрии оправдано и с позиций аппаратурной доступности, и того объема информации, который можно получить с его помощью. Повысить специфичность и достоверность получаемой информации, на основании которой проводится построение дальнейшего дизайна исследования и эксперимент, можно, проводя регистрацию электронных спектров в нескольких, например в трех, разнополярных растворителях. Еще одним приемом, позволяющим повысить достоверность спектрофотометрического эксперимента, является расчет

отношения интенсивности оптической плотности в третьем максимуме ко второму в процентах (Ш/II, %). Безусловным повышением специфичности анализа каротиноидов этим методом является использование СО каротиноидов.

К группе высокоспецифичных методов анализа БАВ, в том числе и каротиноидов, относятся хроматографические. Они являются незаменимыми в процессе получения субстанций каротиноидов с высокой степенью чистоты. Получение каротиноидов методом жидкостной экстракции в сочетании с КХ позволяет выделить субстанции со степенью чистоты не менее 99 %. Методы ТСХ и ВЭЖХ могут быть применены для подтверждения подлинности каротиноидов по таким хроматографическим параметрам, как фактор удерживания и время удерживания. Дополнительно повышению достоверности результатов способствует использование СО каротиноидов.

ГЖХ в исследовании каротиноидов применима лишь для контроля за содержанием остаточных органических растворителей, что определяется особенностями физико-химических свойств каротиноидов.

Метод ВЭЖХ, как наиболее универсальный и специфичный, позволяет решать задачи по определению и подлинности, и степени чистоты каротиноидов. Достоверность этих экспериментальных данных определяется тем, что хроматографическая подвижность является индивидуальной характеристикой любого вещества, в том числе и каротиноида, а применение СО каротиноида представляет результат как более доказательный.

Определение количественного содержания каротиноида в полученном образце следует проводить методами спектрофотометрия в УФ- и видимой областях и ВЭЖХ. В случае предварительного анализа методом спектрофотометрии исследователь может провести расчет количественного содержания каротиноида по величине удельного показателя светопоглощения, для получения окончательного результата – в сравнении с СО каротиноида. Количественный анализ каротиноидов методом ВЭЖХ следует проводить согласно максимально объективному подходу, а именно по внешнему СО. При

работе с субстанциями высокой степени чистоты оба метода анализа показывают сходимые результаты.

В процессе изучения каротиноидов оптимальным, по нашему мнению, является сочетание следующих методов: для установления/подтверждения структуры полученного каротиноида – ЯМР, масс-спектрометрия и ИК-спектроскопия; для подтверждения подлинности – ИК-спектроскопия, спектрофотометрия в УФ- и видимой областях, ТСХ, ВЭЖХ; контроль содержания остаточных органических растворителей – ГЖХ; для количественного определения – спектрофотометрия в УФ- и видимой областях, ВЭЖХ с применением СО каротиноидов.

Результаты аналитического изучения полученных субстанций каротиноидов далее были применены при стабилизации каротиноидов, а также в анализе ЛС промышленного производства, содержащего каротиноиды (Главы 5, 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 4

Анализ субстанций каротиноидов, полученных по разработанной унифицированной технологии, спектральными и хроматографическими методами, позволяет сделать ряд выводов о том, что для достоверного и окончательного подтверждения и/или установления структуры каротиноида следует применять сочетанный анализ методами ЯМР, ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Для предварительной характеристики каротиноидов предпочтительно использовать спектрофотометрию в УФ- и видимой областях. Повышение специфичности метода УФ-спектрофотометрии достигается путем применения S_0 каротиноидов, расчетом соотношения интенсивности поглощения третьего максимума поглощения ко второму (S_3/S_2) в процентах, измерением спектров поглощения растворов каротиноидов в трех разнополярных растворителях, например, в н-гексане, хлороформе, ацетоне.

Доказательно проводить идентификацию каротиноидов можно, используя хроматографические методы, в частности ТСХ и ВЭЖХ. Такие хроматографические методы, как ТСХ, ГЖХ и ВЭЖХ являются приоритетными при изучении степени чистоты выделенных соединений и позволяют оптимизировать некоторые технологические стадии процесса получения каротиноидов.

Выбор метода количественного определения может быть сделан в пользу спектрофотометрии в УФ- и видимой областях или ВЭЖХ (расчет с применением S_0 каротиноида), поскольку при высокой степени чистоты субстанции каротиноида оба метода позволяют получать сопоставимые данные.

Учитывая то, что экспериментальные данные были получены и для каротинов (ликопин, β -каротин), и для ксантофиллов (лютеин, астаксантин), выделенных из объектов растительного (ликопин, β -каротин, лютеин) и животного (астаксантин) происхождения, наиболее передовыми методами фармацевтического анализа, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью, мы считаем, что возможно экстраполировать полученные результаты и теоретические выводы на других представителей этого класса БАВ.

Экспериментально подтвержденный общий подход к выбору методов и анализу каротиноидов как класса БАВ представлен как выход блока А2 (Рисунок 2.4, Глава 2) 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 они могут стать значимой частью IDEF0-модели создания ЛФ с каротиноидами, что зафиксировано в диаграмме детализации дизайна исследования (Рисунок 2.4, Глава 2).

ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СТАБИЛИЗАЦИИ СУБСТАНЦИЙ КАРОТИНОИДОВ И ПОЛУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ НА ИХ ОСНОВЕ

Дизайн практического модуля исследования в нотации IDEF0 (Рисунок 2.4, Глава 2) предполагает дальнейший эксперимент по обоснованию способа стабилизации субстанций каротиноидов и выбору оптимальной ЛФ на примере β -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина, что закреплено функцией блока А3 (Рисунок 2.4, Глава 2).

5.1 Выбор способа стабилизации индивидуальных каротиноидов

Повышенный интерес к каротиноидам [330-333], в частности β -каротину, ликопину, астаксантину, лютеину, в настоящее время обусловлен исследованиями, расширяющими диапазон их фармакологической активности [334-337], которую связывают с уменьшением риска развития сердечно-сосудистых, офтальмологических, нейродегенеративных заболеваний, злокачественных новообразований, повышением иммунного статуса [338-342].

Главным 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 [53, 116]. Такая особенность значительно затрудняет широкое использование этой группы БАВ в практической медицине в составе ЛС [231, 266-268]. Выбор метода «технологической защиты» этого класса соединений предполагает использование таких приемов, которые одновременно обеспечат как стабилизацию каротиноидов, так и сохранность их структуры в процессе получения ЛФ или промежуточного технологического продукта.

В настоящее время включение каротиноидов в состав мягких и твердых желатиновых капсул используется при создании продуктов питания,

космецевтики, личной гигиены и экспериментальной медицины [22, 343, 344]. В главе 1 обобщены способы получения микрокапсул с различными ЛС и показано, что основной задачей микрокапсулирования является повышение стабильности инкапсулируемого материала. Применение такого приема стабилизации в отношении каротиноидов крайне ограничено [229].

Кроме того, микрокапсулы являются «средствами доставки» для многих индивидуальных веществ липофильного характера, нельзя исключить этого и в отношении каротиноидов. Эта способность микрокапсул с гидрофильной оболочкой может быть перспективной при создании в дальнейшем наружных ЛС. Таким образом, микрокапсулирование индивидуальных каротиноидов могло бы вывести на качественно новый виток создание инновационных продуктов, используемых в фармации и практической медицине.

Выбор метода микрокапсулирования каротиноидов осуществлен нами с учетом минимального термического и механического воздействия на субстанции каротиноидов, технической простоты способа и возможности дальнейшего использования на предприятиях среднего и малого фармацевтического бизнеса.

5.1.1 Выбор метода и условий микрокапсулирования индивидуальных каротиноидов

Среди основных параметров, которые учитывались при выборе способа микрокапсулирования, были температурный режим процесса, минимальное число технологических стадий, физико-химические свойства инкапсулируемых веществ, природа полимера, его технологические показатели, ценовая доступность полимера, привлекательность аппаратного оснащения для среднего и малого производства.

Наиболее приемлемыми для фармацевтических целей являются физико-химические методы микрокапсулирования, из которых чаще всего востребованы методы осаждения из водной или органической среды не растворителем [345, 346], второе место по частоте применения занимают простая и сложная

коацервация [347]. Из физических методов исследователи все чаще отдают предпочтение методу экструзии [348].

Полимеры, которые используют для конструирования микросфер, в частности микрокапсул, традиционно делят на две группы: синтетические и природные [349, 350].

Исключительными биосовместимостью и биоразлагаемостью обладают природные полимеры. Большинство синтетических полимеров не подвергается деградации *in vivo*, что может быть одной из причин потенциальной повышенной токсичности. Кроме того, для включения в полость микрокапсул гидрофобных соединений в качестве оболочек широко применяются гидрофильные полиэлектролитные ВМС, например желатин [181, 349, 350].

Другими критериями, в соответствии с которыми в настоящее время принято проводить конструирование микрокапсул, являются обеспечение максимального инкапсулирования действующего вещества; способность полимера оболочки обеспечить высвобождение активного компонента из полости микросферы; стабильность ЛФ в пределах приемлемого срока годности, разрешение для применения ВВ в фармацевтическом производстве [349, 350].

В связи с тем что микрокапсулы в фармацевтической отрасли с каротиноидами ранее не были получены, в эксперименте необходимо было использовать «надежные» ВВ, проверенные многолетним опытом использования и в эксперименте, и в процессе производства.

Учитывая все вышеизложенное, мы в качестве полимерной оболочки микрокапсул выбрали природный полимер белковой природы, гидрофильный полиамфолит – желатин. Желатин марки МК допущен к применению на фармацевтическом производстве для изготовления мягких желатиновых капсул, максимально широко используется в фармацевтических исследованиях, нетоксичный, коммерчески доступный для любого производителя.

Далее нами последовательно были изучены возможности получения желатиновых микрокапсул с β -каротином, ликопином, лютеином и астаксантином различными методами.

С учетом того что в процессе получения микрокапсул методом простой коацервации нагревание не требуется, то этот метод был изучен в первую очередь.

На начальном этапе эксперимент был проведен с 5 %, 10 % и 20 % растворами полимера. По данным литературы [181, 351, 352] и результатам собственных исследований было установлено, что оптимальным для работы является 10 % раствор желатина, поэтому все дальнейшие исследования проводили с этой концентрацией полимера.

Поскольку процесс получения микрокапсул с каротиноидами изучался нами впервые, то необходимо было исследовать все типы солей-осадителей и возможные варианты концентраций их растворов. В качестве солей-осадителей были изучены растворы сульфатов натрия, калия, аммония (5 %, 10 %, 20 %), растворы ацетатов натрия, калия, аммония (5 %, 10 %, 20 %) и растворы хлоридов натрия, калия, аммония (5 %, 10 %, 20 %), т.к. именно эти осадители наиболее часто используются при получении микрокапсул методом простой коацервации [181, 350, 352].

Кроме выбора оптимальной соли-осадителя и концентрации ее раствора, следовало выбрать соотношение полимер:каротиноид – полимер:соль. Традиционно при получении микрокапсул методом простой коацервации используется соотношение 1:1 [181, 350, 352]. Так как нами впервые изучалась возможность получения микрокапсул с каротиноидами этим способом, 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 и далее было использовано в эксперименте.

Условия получения микрокапсул методом коацервации описаны в главе 2.

Результаты получения микрокапсул этим методом для субстанций β -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина представлены в таблицах 5.1. – 5.3, 5.4 – 5.6, 5.7 – 5.9 и 5.10 – 5.12 соответственно.

Таблица 5.1 – Результаты коацервации при использовании натриевых солей-осадителей (активное вещество – β -каротин)

Соотношение полимер:соль	Натрия сульфат			Натрия ацетат			Натрия хлорид		
	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %
2:1	–*	–	–	–	–	–	–	–	–
1:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:2	–	–	+**	–	–	–	–	–	–

Таблица 5.2 – Результаты коацервации при использовании калиевых солей-осадителей (активное вещество – β -каротин)

Соотношение полимер:соль	Калия сульфат			Калия ацетат			Калия хлорид		
	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %
2:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:2	–	–	+	–	–	–	–	–	–

Таблица 5.3 – Результаты коацервации при использовании аммониевых солей-осадителей (активное вещество – β -каротин)

Соотношение полимер:соль	Аммония сульфат			Аммония ацетат			Аммония хлорид		
	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %
2:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:2	–	–	+	–	–	–	–	–	–

*– образование микрокапсул не происходило; **+ наблюдали образование микрокапсул.

Таблица 5.4 – Результаты коацервации при использовании натриевых солей-осадителей (активное вещество – ликопин)

Соотношение полимер:соль	Натрия сульфат			Натрия ацетат			Натрия хлорид		
	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %
2:1	–*	–	–	–	–	–	–	–	–
1:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:2	–	–	+**	–	–	–	–	–	–

Таблица 5.5 – Результаты коацервации при использовании калиевых солей-осадителей (активное вещество – ликопин)

Соотношение полимер:соль	Калия сульфат			Калия ацетат			Калия хлорид		
	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %
2:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:2	–	–	+	–	–	–	–	–	–

Таблица 5.6 – Результаты коацервации при использовании аммониевых солей-осадителей (активное вещество – ликопин)

Соотношение полимер:соль	Аммония сульфат			Аммония ацетат			Аммония хлорид		
	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %
2:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:2	–	–	+	–	–	–	–	–	–

*– образование микрокапсул не происходило; **+ наблюдали образование микрокапсул.

Таблица 5.7 – Результаты коацервации при использовании натриевых солей-осадителей (активное вещество – лютеин)

Соотношение полимер:соль	Натрия сульфат			Натрия ацетат			Натрия хлорид		
	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %
2:1	–*	–	–	–	–	–	–	–	–
1:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:2	–	–	+**	–	–	–	–	–	–

Таблица 5.8 – Результаты коацервации при использовании калиевых солей-осадителей (активное вещество – лютеин)

Соотношение полимер:соль	Калия сульфат			Калия ацетат			Калия хлорид		
	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %
2:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:2	–	–	+	–	–	–	–	–	–

Таблица 5.9 – Результаты коацервации при использовании аммониевых солей-осадителей (активное вещество – лютеин)

Соотношение полимер:соль	Аммония сульфат			Аммония ацетат			Аммония хлорид		
	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %
2:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:2	–	–	–	–	–	–	–	–	–

*– образование микрокапсул не происходило; **+ наблюдали образование микрокапсул.

Таблица 5.10 – Результаты коацервации при использовании натриевых солей-осадителей (активное вещество – астаксантин)

Соотношение полимер:соль	Натрия сульфат			Натрия ацетат			Натрия хлорид		
	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %
2:1	–*	–	–	–	–	–	–	–	–
1:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:2	–	–	+**	–	–	–	–	–	–

Таблица 5.11 – Результаты коацервации при использовании калиевых солей-осадителей (активное вещество – астаксантин)

Соотношение полимер:соль	Калия сульфат			Калия ацетат			Калия хлорид		
	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %
2:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:2	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Таблица 5.12 – Результаты коацервации при использовании аммониевых солей-осадителей (активное вещество – астаксантин)

Соотношение полимер:соль	Аммония сульфат			Аммония ацетат			Аммония хлорид		
	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %
2:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1:2	–	–	–	–	–	–	–	–	–

*– образование микрокапсул не происходило; **+ наблюдали образование микрокапсул.

Анализ данных таблиц 5.1 – 5.3 показывает, что образование микрокапсул обеспечивают соли серной кислоты – натрия сульфат, калия сульфат и аммония сульфат. Из трех концентраций растворов этих солей-осадителей, участвовавших в эксперименте, образование микрокапсул с β -каротином вызывали только 20 % растворы. Микрокапсулирование каротиноида происходило, если соотношение полимер:соль составляло 1:2. При использовании в качестве осадителей ацетатов и хлоридов натрия, калия и аммония в изученных условиях получить микрокапсулы с β -каротином не удалось.

Экспериментальные данные таблиц 5.4 – 5.6 свидетельствуют, что образование микрокапсул с ликопином происходит в следующих условиях: соотношение полимер:ликопин – 1:1; соотношение полимер:соль-осадитель – 1:2; образование микрокапсул вызывали соли-осадители – 20 % раствор натрия сульфата, 20 % раствор калия сульфата, 20 % раствор аммония сульфата. Аналогично эксперименту в β -каротином ацетаты натрия, калия, аммония и хлориды этих катионов не показали положительного результата.

Как следует из таблиц 5.7 – 5.9, для субстанции лютеина микрокапсулы получены для соотношений полимер:лютеин – 1:1; полимер:соль-осадитель – 1:2; формирование микрокапсул обеспечили 20 % раствор натрия сульфата и 20 % раствор калия сульфата (Таблицы 5.7 – 5.9). В отличие от эксперимента с β -каротином и ликопином 20 % раствор аммония сульфата не приводил к образованию микрокапсул с лютеином. Все хлориды и ацетаты не позволили получить микрокапсулы с лютеином.

По данным таблиц 5.10 – 5.12 микрокапсулирование астаксантина наблюдается для соотношений полимер:астаксантин – 1:1; полимер:соль-осадитель – 1:2. Единственный раствор соли, который позволили получить микрокапсулы с этим каротиноидом, – это 20 % раствор натрия сульфата.

Таким образом, экспериментальные данные показывают, что ацетаты и хлориды натрия, калия и аммония не приводили к образованию микрокапсул ни с одним из изучаемых каротиноидов. Соль, которая вызывала образование микрокапсул со всеми четырьмя каротиноидами – это 20 % раствор натрия

сульфата. Раствор калия сульфата способствовал микрокапсулированию трех из четырех каротиноидов – β -каротина, ликопина и лютеина, а сульфат аммония – двух из четырех: β -каротина и ликопина. Следовательно, наиболее приемлемой солью-осадителем для изученных каротиноидов является 20 % натрия сульфата.

Для обоснования дальнейших исследований по получению микрокапсул с каротиноидами методом коацервации нами проведен сравнительный анализ полученных микрокапсул по технологическим показателям и выявлен процент включения действующих компонентов в микрокапсулы. В качестве технологических характеристик были выбраны внешний вид, агрегация и фракционный состав микрокапсул (Таблица 5.13).

Таблица 5.13 – Характеристика микрокапсул, полученных методом простой коацервации

Внешний вид микрокапсул, наличие агрегации	Фракционный состав, %		
	менее 0,5 мм	0,5 – 1,0 мм	более 1,0 мм
1	2	3	4
<i>Микрокапсулы с β-каротином (осадитель – 20 % раствор натрия сульфата)</i>			
Микрокапсулы правильной округлой формы, желто-оранжевого цвета, наблюдается частичная агрегация	3,2	81,4	15,4
<i>Микрокапсулы с β-каротином (осадитель – 20 % раствор калия сульфата)</i>			
Микрокапсулы неправильной формы, желто-оранжевого цвета, наблюдается агрегация	2,9	79,3	17,8
<i>Микрокапсулы с β-каротином (осадитель – 20 % раствор аммония сульфата)</i>			
Микрокапсулы неправильной формы, желто-оранжевого цвета, наблюдается агрегация	2,7	76,1	21,2
<i>Микрокапсулы с ликопином (осадитель – 20% раствор натрия сульфата)</i>			
Микрокапсулы правильной округлой формы, красного цвета, наблюдается частичная агрегация	2,5	80,2	17,3

Продолжение таблицы 5.13

1	2	3	4
<i>Микрокапсулы с ликопином (осадитель – 20 % раствор калия сульфата)</i>			
Микрокапсулы неправильной округлой формы, красного цвета, наблюдается агрегация	1,2	76,9	21,9
<i>Микрокапсулы с ликопином (осадитель – 20 % раствор аммония сульфата)</i>			
Микрокапсулы неправильной формы, красного цвета, наблюдается агрегация	1,4	74,3	24,3
<i>Микрокапсулы с лютеином (осадитель – 20 % раствор натрия сульфата)</i>			
Микрокапсулы правильной округлой формы, желтого цвета, наблюдается частичная агрегация	1,9	81,4	16,7
<i>Микрокапсулы с лютеином (осадитель – 20 % раствор калия сульфата)</i>			
Микрокапсулы неправильной формы, желтого цвета, наблюдается значительная агрегация	0,9	74,2	24,9
<i>Микрокапсулы с астаксантином (осадитель – 20 % раствор натрия сульфата)</i>			
Микрокапсулы правильной округлой формы, ярко-красного цвета, наблюдается частичная агрегация	2,1	83,1	14,8

Несмотря на промывание спиртом изобутиловым, для всех полученных микрокапсул наблюдалась агрегация. Наибольшая фракция микрокапсул имеет размер частиц от 0,5 до 1 мм (около 83 %), размер до 0,5 мм имеет лишь около 3,0 %, микросферы с размером более 1 мм составляют в некоторых случаях до 25 % (Таблица 5.13). Подобное соотношение прослеживается для всех серий микрокапсул.

Далее необходимо было определить процент включения активного компонента в полость микрокапсул при использовании метода простой коацервации.

Контроль содержания каротиноидов в микрокапсулах проводили спектрофотометрически (Глава 2) (Таблица 5.14).

Таблица 5.14 – Количество активного компонента, включенного в микрокапсулы

Микрокапсулы и условия их получения	Процент включения активного компонента*, %
Микрокапсулы с β -каротином (осадитель – 20 % раствор натрия сульфата)	69,5
Микрокапсулы с β -каротином (осадитель – 20 % раствор калия сульфата)	61,4
Микрокапсулы с β -каротином (осадитель – 20 % раствор аммония сульфата)	57,6
Микрокапсулы с ликопином (осадитель – 20 % раствор натрия сульфата)	67,2
Микрокапсулы с ликопином (осадитель – 20 % раствор калия сульфата)	60,8
Микрокапсулы с ликопином (осадитель – 20 % раствор аммония сульфата)	54,1
Микрокапсулы с лютеином (осадитель – 20 % раствор натрия сульфата)	69,4
Микрокапсулы с лютеином (осадитель – 20 % раствор калия сульфата)	59,7
Микрокапсулы с астаксантином (осадитель – 20 % раствор натрия сульфата)	68,6

* – средние значения получены по результатам шести параллельных определений, обработаны статистически ($p=0,95$).

Максимальную инкапсуляцию каротиноидов обеспечивает дегидратирующий агент – 20 % раствор натрия сульфата и именно эти капсулы имеют приемлемый внешний вид и фракционный состав (Таблиц 5.13). Однако уровень включения каротиноидов, по нашему мнению, был недостаточный, т.к. по данным литературы путем коацервации возможно добиться 90 % включения активных ингредиентов в полость микрокапсул [351-355], что в комплексе с

неудовлетворительными технологическими характеристиками микрокапсул послужило причиной отказа от этого способа микрокапсулирования.

В связи с вышеизложенным далее изучили возможность получения микрокапсул методом экструзии (Глава 2).

Поскольку каротиноиды являются термолабильными соединениями, то мы использовали методику, применяемую для микрокапсулирования биологического материала [356, 357], позволяющую конструировать микрокапсулы без нагревания [202, 203]. Традиционно микрокапсулирование проводят из растворов пленкообразователя желатина с концентрацией 30 % и 40 %. Так как получение микрокапсул с каротиноидами методом экструзии проводилось впервые, то были исследованы концентрации желатина в пределах от 20 % до 50 %. Экспериментальные данные для различных концентраций пленкообразователя представлены в таблице 5.15.

Таблица 5.15 Результаты получения микрокапсул методом экструзии

Активный ингредиент	Условия получения микрокапсул							
	желатин 20 %		желатин 30 %		желатин 40 %		желатин 50 %	
	1*	2**	1	2	1	2	1	2
β-Каротин	— ^{***}	—	+ ^{****}	+	+	+	—	—
Ликопин	—	—	+	+	+	+	—	—
Лютеин	—	—	+	+	+	+	—	—
Астаксантин	—	—	+	+	+	+	—	—

1* – 0,2 М раствор кальция хлорида; ** – вода при температуре от +5 °С; —*** – микрокапсулы не были получены; +**** – микрокапсулы были получены.

Данные таблица 5.15 свидетельствуют о возможности получения микрокапсул из 30 % и 40 % растворов полимера, причем формирование микросфер происходит под действием отверждающего агента – 0,2 М раствора кальция хлорида или в результате охлаждения раствора полимера до +5 °С.

Далее были определены технологические характеристики полученных микрокапсул (Таблица 5.16).

Таблица 5.16 – Некоторые технологические характеристики микрокапсул, полученных методом экструзии

Активный ингредиент	Условия получения микрокапсул и их характеристика			
	желатин 30 %		желатин 40 %	
	1*	2**	1	2
β-Каротин	форма частиц неоднородная, цвет желто-оранжевый, малая прочность	неправильная форма частиц, цвет желто-оранжевый, консистенция желеобразная	форма частиц округлая, цвет желто-оранжевый, механически мало прочные	форма частиц округлая, цвет желто-оранжевый, механически мало прочные
Ликопин	форма частиц неоднородная, цвет красный, малая прочность	форма частиц неправильная, цвет красный, консистенция желеобразная	форма частиц округлая, цвет красный, механически мало прочные	форма частиц округлая, цвет красный, механически мало прочные
Лютеин	форма частиц неоднородная, желтый цвет, малая прочность	неправильная форма частиц, желтый цвет, консистенция желеобразная	частицы правильной формы, желтого цвета, механически мало прочные	частицы правильной формы, желтого цвета, механически мало прочные
Астаксантин	форма частиц неоднородная, ярко-красный цвет, малая прочность	форма частиц неправильная, ярко-красный цвет, консистенция желеобразная	частицы округлой формы, ярко-красного цвета, механически мало прочные	частицы округлой формы, ярко-красного цвета, механически мало прочные

1* – 0,2 М раствор кальция хлорида; 2** – вода при температуре от +5 °С.

Показано, что неоднородные по форме микрокапсулы получены из 30 % раствора желатина. Применение 40 % раствора полимера обеспечивают получение частиц округлой формы. Оба сшивающих агента формируют частицы

невысокой прочности. Кроме того, при использовании в качестве отверждающей среды воды, охлажденной до +5 °С, микрокапсулы необходимо достаточно быстро извлекать из среды охладителя, т.к. происходит их частичное набухание, что приводит к деструкции оболочки. При необходимости совершенствования этого способа получения микрокапсул с каротиноидами в качестве среды охлаждения будет рационально апробировать низкомолекулярные спирты.

Для решения вопроса о перспективности оптимизации технологических параметров микрокапсул, получаемых из 40 % раствора желатина методом экструзии, следовало предварительно изучить равномерность включения активного компонента в полость микрокапсул. Используемые в работе субстанции каротиноидов имеют характерную окраску. Изучение микрокапсул под микроскопом показало неравномерность включения активных компонентов в микрокапсулы, т.к. имелись неокрашенные, «пустые» микрокапсулы (около 30 %), т.е. включение каротиноидов в полости нельзя считать равномерным.

Основной технологической проблемой при получении микрокапсул методом экструзии является то, что каротиноиды – липофильные соединения, а для получения суспензии с равномерным распределением каротиноида по всей массе пленкообразователя необходимо интенсивное механическое воздействие на смесь в процессе диспергирования, что может быть причиной изомеризации каротиноида. По нашему мнению, при оптимизации технологической операции «Диспергирование каротиноида в среде пленкообразователя» именно данная стадия будет «критической точкой» при адаптации технологической схемы для нужд производства.

Следующий способ, который был апробирован для микрокапсулирования каротиноидов, – это диспергирование в несмешивающейся жидкости.

Собственные пилотные исследования различных серий микрокапсул [358] показали, что наиболее удачными с технологических позиций были микрокапсулы, полученные с применением 30 % раствора пленкообразователя желатина, пластификатора – глицерина и изопропанола для промывания микрокапсул.

Оксид титана (IV), будучи красителем, применяемым в фармацевтическом производстве, проявляет свойства «замутнителя» полимера и тем самым предохраняет инкапсулируемые вещества от воздействия света [359]. Принимая во внимание то, что каротиноиды – светочувствительные соединения, в оболочку микрокапсул дополнительно включили 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 несмешиваемой жидкости, температура, при которой происходит образование микрокапсул, соотношение несмешиваемых фаз.

Поскольку при конструировании микрокапсул методами коацервации и экструзии не удалось достичь удовлетворительных технологических характеристик микросфер, то далее было уточнено количество пластификатора в прописи.

Количество пластификатора, в частности глицерина, определяет прочность и при этом эластичность стенок микрокапсул [181, 349, 350]. При планировании эксперимента учитывали количество пластификатора от 1,5 до 6,0 %. Получены серии микрокапсул в различных несмешиваемых жидкостях: – масла подсолнечное, оливковое, вазелиновое с соотношением полимер:масло – 1:3 (Таблицы 5.17 – 5.19).

Таблица 5.17 – Результаты получения микрокапсул с каротиноидами (несмешивающаяся среда – масло подсолнечное)

Каротиноид	Состав на 100,0 г продукта микрокапсул (выход – 97 %)							
	Каротиноид	2,50	Каротиноид	2,50	Каротиноид	2,50	Каротиноид	2,50
	Желатин	30,00	Желатин	30,00	Желатин	30,00	Желатин	30,00
	Вода очищенная	65,78	Вода очищенная	64,28	Вода очищенная	62,78	Вода очищенная	61,28
	Глицерин (1,5 %)	1,50	Глицерин (3,0 %)	3,00	Глицерин (4,5 %)	4,50	Глицерин (6,0 %)	6,00
	Оксид титана (IV)	0,20	Оксид титана (IV)	0,20	Оксид титана (IV)	0,20	Оксид титана (IV)	0,20
	Твин-80	0,02	Твин-80	0,02	Твин-80	0,02	Твин-80	0,02
Ликопин	+*	форма микрокапсул –	+	форма микрокапсул –	+	форма микрокапсул –	+	форма микрокапсул –
β-Каротин	+	овальная, стенки	+	сферическая, стенки	+	неоднородная, стенки	+	неоднородная, стенки
Лютеин	+	непрозрачные,	+	непрозрачные,	+	непрозрачные,	+	непрозрачные, мягкие,
Астаксантин	+	«хрупкие», агрегация не наблюдалась	+	эластичные, агрегация не наблюдалась	+	эластичные, агрегация наблюдалась	+	агрегация наблюдалась

Примечание: *+ наблюдали образование микрокапсул.

Таблица 5.18 – Результаты получения микрокапсул с каротиноидами (несмешивающаяся среда – масло оливковое)

Каротиноид	Состав на 100,0 г продукта микрокапсул (выход – 97%)							
	Каротиноид	2,50	Каротиноид	2,50	Каротиноид	2,50	Каротиноид	2,50
	Желатин	30,00	Желатин	30,00	Желатин	30,00	Желатин	30,00
	Вода очищенная	65,78	Вода очищенная	64,28	Вода очищенная	62,78	Вода очищенная	61,28
	Глицерин (1,5 %)	1,50	Глицерин (3,0 %)	3,00	Глицерин (4,5 %)	4,50	Глицерин (6,0 %)	6,00
	Оксид титана (IV)	0,20	Оксид титана (IV)	0,20	Оксид титана (IV)	0,20	Оксид титана (IV)	0,20
	Твин-80	0,02	Твин-80	0,02	Твин-80	0,02	Твин-80	0,02
Ликопин	+*	форма микрокапсул –	+	форма микрокапсул –	+	форма микрокапсул –	+	форма микрокапсул –
β-Каротин	+	неоднородная, стенки	+	неоднородная, стенки	+	неоднородная, стенки	+	неоднородная, стенки
Лютеин	+	непрозрачные,	+	непрозрачные,	+	непрозрачные,	+	непрозрачные, мягкие,
Астаксантин	+	«хрупкие», агрегация не наблюдалась	+	эластичные, агрегация не наблюдалась	+	эластичные, агрегация наблюдалась	+	агрегация наблюдалась

Примечание: *+ наблюдали образование микрокапсул.

Таблица 5.19 – Результаты получения микрокапсул с каротиноидами (несмешивающаяся среда – масло вазелиновое)

Каротиноид	Состав на 100,0 г продукта микрокапсул (выход – 97%)							
	Каротиноид 2,50		Каротиноид 2,50		Каротиноид 2,50		Каротиноид 2,50	
	Желатин 30,00		Желатин 30,00		Желатин 30,00		Желатин 30,00	
	Вода очищенная 65,78		Вода очищенная 64,28		Вода очищенная 62,78		Вода очищенная 61,28	
	Глицерин (1,5 %) 1,50		Глицерин (3,0 %) 3,00		Глицерин (4,5 %) 4,50		Глицерин (6,0 %) 6,00	
	Оксид титана (IV) 0,20		Оксид титана (IV) 0,20		Оксид титана (IV) 0,20		Оксид титана (IV) 0,20	
	Твин-80 0,02		Твин-80 0,02		Твин-80 0,02		Твин-80 0,02	
Ликопин	+	форма микрокапсул –	+	форма микрокапсул –	+	форма микрокапсул –	+	форма микрокапсул –
β-Каротин	+	неоднородная, стенки	+	неоднородная, стенки	+	неоднородная, стенки	+	неоднородная, стенки
Лютеин	+	непрозрачные,	+	непрозрачные,	+	непрозрачные,	+	непрозрачные, мягкие,
Астаксантин	+	«хрупкие», агрегация не наблюдалась	+	эластичные, агрегация не наблюдалась	+	эластичные, агрегация наблюдалась	+	агрегация наблюдалась

Примечание: *+ наблюдали образование микрокапсул.

Данные таблиц 5.17 – 5.19 показывают, что во всех случаях наблюдали образование микрокапсул, которые все же отличались по технологическим характеристикам. Так, наиболее оптимальными по прочности и эластичности оказались микрокапсулы, полученные по прописи с 3,0 % содержанием глицерина.

Количество глицерина в желатиновой массе с 4,5 % и 6,0 % хотя и обеспечивает получение микрокапсул, но вызывает значительную агрегацию готового продукта. Микрокапсулы, полученные по прописи с содержанием пластификатора 1,5 %, являются достаточно «хрупкими».

При использовании в качестве гидрофобной среды масла подсолнечного по всем апробированным прописям был получен продукт со сферической и неоднородной формой. Для оливкового и вазелинового масел форма микрокапсул по всем прописям была неоднородна. Агрегация зафиксирована для продукта с содержанием глицерина в оболочке 4,5 и 6,0 %, причем для всех трех гидрофобных сред.

Агрегация конечного продукта не наблюдается при содержании глицерина в прописи 1,5 и 3,0 %, однако в эксперименте с оливковым и вазелиновым маслами форма микрокапсул была неоднородная. Кроме того, для прописи с содержанием глицерина 1,5 % стенки микрокапсулы были «хрупкие».

Необходимо отметить непрозрачность микрокапсул, полученных по всем прописям. Это послужило основанием в последующих исследованиях использовать в составе оболочки микрокапсул оксид титана (IV) в количествах 0,2 %.

Далее тестировали только состав с содержанием глицерина 3,0 %. Поскольку природа гидрофобной фазы, соотношение гидрофильной и гидрофобной фаз и температура микрокапсулирования оказывают значительное влияние на фракционный состав готового продукта [360-362], нами было изучено влияние этих параметров на качество микрокапсул (Таблица 5.20).

Таблица 5.20 – Технологические характеристики полученных микрокапсул

Соотноше- ние фаз	Температура формирования микрокапсул, °С			
	20	30	40	50
1	2	3	4	5
<i>масло подсолнечное</i>				
1:2	неоднородная форма, наблюдалась агрегация	форма округлая, наблюдалась агрегация	форма округлая, наблюдалась агрегация	форма округлая, наблюдалась агрегация
1:3	неоднородная форма, наблюдалась агрегация	неоднородная форма, агрегация не наблюдалась	форма округлая, агрегация не наблюдалась	форма округлая, агрегация не наблюдалась
1:5	неоднородная форма, наблюдалась частичная агрегация	неоднородная форм, агрегация не наблюдалась	форма округлая, агрегация не наблюдалась	форма округлая, агрегация не наблюдалась
<i>масло оливковое</i>				
1:2	неоднородная форма, наблюдалась агрегация	форма округлая, наблюдалась агрегация	форма округлая, наблюдалась агрегация	форма округлая, наблюдалась агрегация
1:3	неоднородная форма, наблюдалась агрегация	неоднородная форма, агрегация не наблюдалась	форма округлая, агрегация не наблюдалась	форма округлая, агрегация не наблюдалась
1:5	неоднородная форма, наблюдалась частичная агрегация	неоднородная форма, агрегация не наблюдалась	форма округлая, агрегация не наблюдалась	форма округлая, агрегация не наблюдалась
<i>масло вазелиновое</i>				
1:2	неоднородная форма, наблюдалась агрегация	форма округлая, наблюдалась агрегация	форма округлая, наблюдалась агрегация	форма округлая, наблюдалась агрегация
1:3	неоднородная форма, наблюдалась агрегация	неоднородная форма, агрегация не наблюдалась	форма округлая, агрегация не наблюдалась	форма округлая, агрегация не наблюдалась
1:5	неоднородная форма, наблюдалась частичная агрегация	неоднородная форма, агрегация не наблюдалась	форма округлая, агрегация не наблюдалась	форма округлая, агрегация не наблюдалась

Технологические характеристики микрокапсул, представленные в таблице 5.20, показывают, что экспериментально установлена оптимальная область конструирования микрокапсул. Она ограничена температурным режимом от 40 до 50 °С и соотношением несмешивающихся фаз – 1:3 и/или 1:5. Следует отметить, что эти параметры были зафиксированы для всех трех видов дисперсионной среды. Для всех апробированных значений температуры (20, 30, 40, 50 °С) и соотношения фаз 1:2 наблюдалась агрегация микрокапсул.

Температуру 20 °С можно считать непригодной для получения микрокапсул с каротиноидами способом диспергирования в несмешивающейся жидкости, т.к. для всех масел и изученных соотношений несмешивающихся фаз наблюдалась агрегация микрокапсул.

По причине агрегации микрокапсул нами из дальнейшего эксперимента было исключено соотношение фаз 1:2.

Повышение температуры до 30 °С снижет агрегацию готового продукта. Однако от этого температурного режима мы в дальнейшем отказались, т.к. форма микрокапсул была неоднородная, причем и для соотношений 1:3 и 1:5.

Так как экспериментально определены два приемлемых температурных режима и соотношения несмешивающихся фаз, то следовало выбрать оптимальный из каждой пары параметров.

Наиболее благоприятный характер дисперсионной среды, соотношение полимер:масло и температура были определены на основании результатов анализа фракционного состава (Таблица 5.21) и технологических свойств микрокапсул (Таблица 5.22).

Таблица 5.21 – Результаты гранулометрического состава микрокапсул

Дисперсионная среда	<0,25 мм	0,25 – 0,5 мм	0,5 – 1,0 мм	> 1,0 мм
1	2	3	4	5
полимерная фаза:масло (1:3), температура – 40 °С				
Масло подсолнечное	11,2	37,4	39,6	11,8
Масло оливковое	7,2	8,7	42,5	41,6
Масло вазелиновое	10,4	12,2	45,6	31,8
полимерная фаза:масло (1:3), температура – 50 °С				
Масло подсолнечное	10,2	35,2	39,6	15,0
Масло оливковое	6,1	11,9	51,7	30,3
Масло вазелиновое	12,4	10,9	40,7	36,0
полимерная фаза:масло (1:5), температура – 40 °С				
Масло подсолнечное	13,7	28,8	30,1	27,4
Масло оливковое	12,5	10,6	44,7	32,2
Масло вазелиновое	10,2	11,3	39,7	38,8
полимерная фаза:масло (1:5), температура – 50 °С				
Масло подсолнечное	11,0	35,3	32,7	21,0
Масло оливковое	14,1	12,1	49,3	24,5
Масло вазелиновое	11,8	9,8	42,8	35,6

Данные таблицы 5.21 демонстрируют, что наиболее однородный фракционный состав микрокапсул образуется при использовании в качестве дисперсионной среды масла подсолнечного, для соотношений полимер:масло 1:3 и 1:5 и температуре 40 °С и 50 °С. Для микрокапсул, полученных в этих условиях, характерно распределение по двум основным фракциям с размерами частиц от 0,25 до 0,5 мм и от 0,5 до 1,0 мм.

В случаях с маслами оливковым и вазелиновым размер микрокапсул несколько больше: от 0,5 до 1,0 мм и более 1,0 мм. Причем такое распределение по фракциям сохраняется и при 40 °С, и 50 °С. Чтобы выбрать оптимальные

условия получения микрокапсул для всех серий микрокапсул были определены сыпучесть и насыпная масса (Таблица 5.22).

Таблица 5.22 – Результаты определения сыпучести и насыпной массы микрокапсул

Дисперсионная среда	Сыпучесть, г/с	Насыпная масса, г/см ³
1	2	3
полимер:масло (1:3), температура – 40 °С		
Масло подсолнечное	10,5	0,61
Масло оливковое	11,4	0,53
Масло вазелиновое	12,5	0,56
полимер:масло (1:3), температура – 50 °С		
Масло подсолнечное	9,3	0,57
Масло оливковое	10,5	0,50
Масло вазелиновое	11,1	0,46
полимер:масло (1:5), температура – 40 °С		
Масло подсолнечное	12,3	0,65
Масло оливковое	11,7	0,60
Масло вазелиновое	11,0	0,57
полимер:масло (1:5), температура – 50 °С		
Масло подсолнечное	12,0	0,61
Масло оливковое	11,1	0,59
Масло вазелиновое	10,8	0,57

Более привлекательными с этих позиций (Таблица 5.22) оказались серии, полученные при соотношении полимер:дисперсионная среда – 1:3 и 1:5 и при использовании в качестве последней масла подсолнечного. Результаты аналогичны для обоих температурных режимов.

Суммируя экспериментальные данные технологических свойств микрокапсул нескольких серий и учитывая термолабильность каротиноидов, мы отдали предпочтение температурному режиму – 40 °С. Выбор в пользу соотношения полимер:масло 1:3 основан на том, что масштабирование

технологии приведет к неоправданному перерасходу масла, поэтому для получения микрокапсул с каротиноидами методом диспергирования в несмешивающейся жидкости были выбраны следующие условия: дисперсионная среда – масло подсолнечное, соотношение полимер:масло – 1:3, температура – 40 °С.

Обобщая весь полученный экспериментальный материал, мы сделали выбор в пользу способа диспергирования в несмешивающейся жидкости.

5.1.2 Технология получения микрокапсул с каротиноидами

На основании проведенных исследований разработан и предложен следующий состав микрокапсул на 100 г готового продукта и нормы загрузки с учетом 3 % потерь (Таблица 5.23).

Таблица 5.23 – Состав микрокапсул и нормы загрузки

Состав на 100,0 г		Норма загрузки (потери – 3 %)	
Каротиноид	2,500	Каротиноид	2,580
Желатин	30,00	Желатин	30,90
Вода очищенная	64,28	Вода очищенная	66,21
Глицерин	3,000	Глицерин	3,090
Оксид титана (IV)	0,200	Оксид титана (IV)	0,206
Твин-80	0,020	Твин-80	0,021

Для получения микрокапсул обоснован выбор физико-химического способа получения микрокапсул – диспергирование в несмешивающейся жидкости.

Обобщенная традиционная схема производства микрокапсул представлена на рисунке 5.1 и включает три технологические стадии: вспомогательные работы – ВР, основной технологический процесс – ТП, фасовка, упаковки и отгрузка готовой продукции – УМО. Стадии, для которых обязательно проведение технологического, химического и микробиологического контролей, отмечены в схеме символами K_T , K_X и K_M .

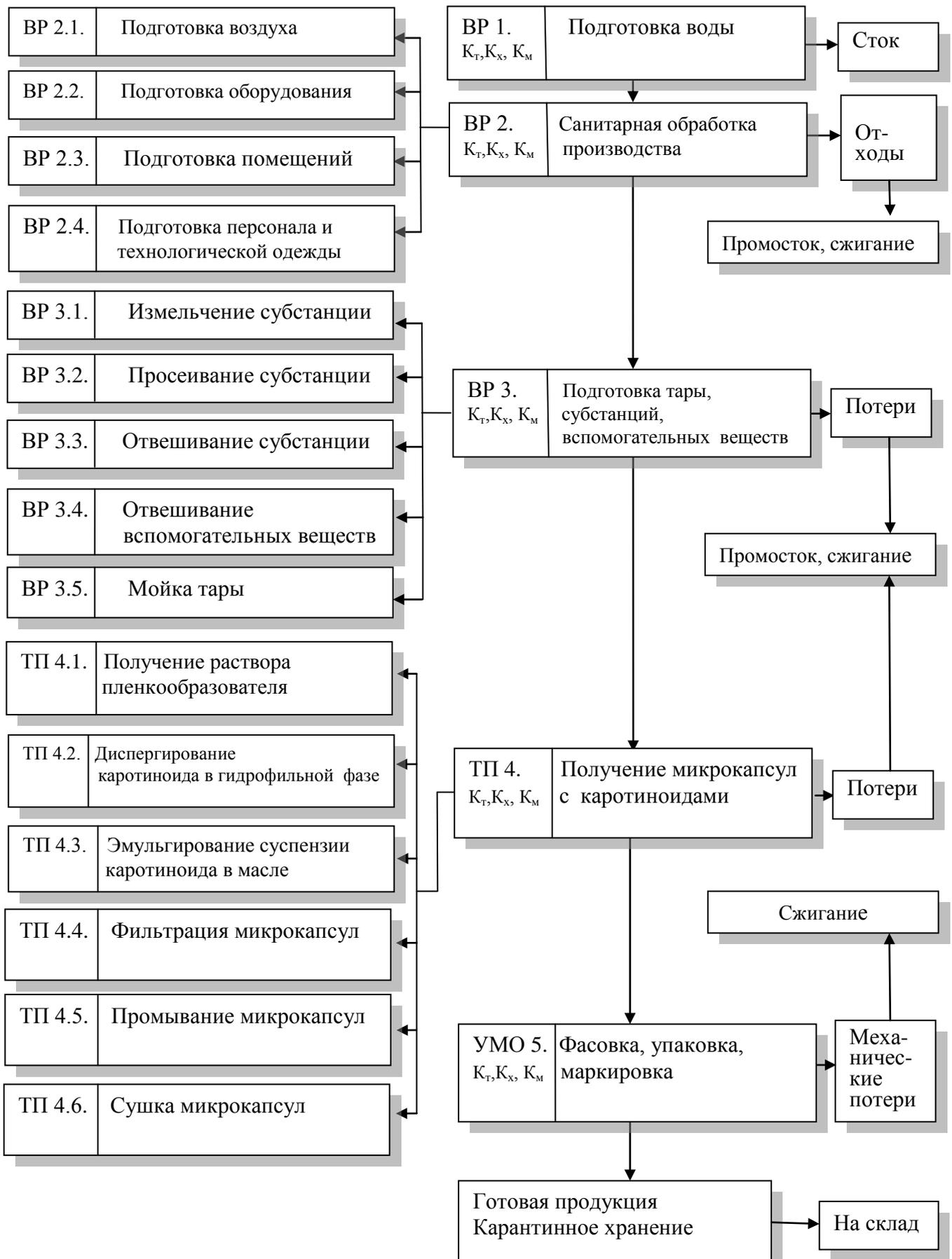


Рисунок 5.1 – Технологическая схема получения микрокапсул с каротиноидами
 K_T , K_X и K_M – технологический, химический и микробиологический контроль

На этапе ВР.1 проводится подготовка воды для производства.

Операция ВР.2 подразумевает подготовку воздуха, производственных помещений и оборудования, персонала и технологической одежды.

На этапе ВР.3 проводится подготовка субстанций каротиноидов и вспомогательных веществ: измельчение, просеивание и отвешивание субстанций β -каротина, ликопина, лютеина, астаксантина, отвешивание необходимых количеств вспомогательных веществ – желатина, глицерина, оксида титана (IV), Твина-80, отмеривание воды, масла и изопропилового спирта.

В рамках мероприятий стадии ВР.3 проводится подготовка тары – широкогорлых флаконов темного стекла.

Основной технологический процесс описывается стадией ТП.4. Она включает шесть взаимосвязанных операций.

ТП.4.1 – получение 30 % раствора желатина, который является пленкообразователем.

ТП.4.2 – диспергирование субстанции одного из четырех предлагаемых каротиноидов с эмульгатором Твином-80 в растворе пленкообразователя.

ТП.4.3 – эмульгирование суспензии каротиноида в масле. Для производства микрокапсул использовали реактор УПМ-2 (ЗМА «Дружба», г. Враца), снабженный мешалкой якорного типа и паровой рубашкой. В качестве несмешивающейся жидкости предложено масло подсолнечное. В масло, подогретое до 40 °С, вводили суспензию каротиноида в растворе пленкообразователя и перемешивали 10 мин. Диспергирование продолжали до образования мягких микрокапсул, затем резко снижали температуру до 15 °С, подавая в рубашку реактора холодную воду. По окончании диспергирования микрокапсулы в масле выгружали в приемник.

ТП.4.4 – отделение микрокапсул от дисперсионной среды при помощи набора сит. С учетом ранее определенного фракционного состава микрокапсул использовали сито с диаметром пор 1,0 мм.

ТП.4.5 – промывание микрокапсул изопропиловым спиртом.

ТП.4.6 – сушка микрокапсул при комнатной температуре в течение 7-8 ч. Завершающей является стадия УМО 5, в соответствии с которой осуществляются фасовка готовых микрокапсул в широкогорлые флаконы темного стекла, упаковка и маркировка. Готовая продукция поступает на карантинное хранение и затем на склад.

Предложенная технология получения микрокапсул может использоваться и как самостоятельный технологический процесс, и как базовый комплекс мероприятий при производстве капсул и других ЛФ. В связи с тем что микрокапсулирование позволяет предохранять лабильные вещества от негативного воздействия факторов внешней среды, мы предположили, что микрокапсулирование может быть использовано как способ «технологической защиты» субстанций каротиноидов. Для подтверждения этой идеи далее провели сравнительное изучение стабильности каротиноидов.

5.2 Результаты изучения стабильности микрокапсулированных субстанций каротиноидов

Поскольку основная цель, в соответствии с которой разрабатывались условия заключения каротиноидов в микрокапсулы, – это стабилизация индивидуальных каротиноидов, а также создание варианта их доставки 1-го поколения, то далее следовало провести сравнительное изучение стабильности микрокапсулированных субстанций каротиноидов и без включения в микрокапсулы. Реализация этой задачи предполагала контроль качественного и количественного состава каротиноидов. С этой целью логично было использовать спектрофотометрическую методику, адаптированную для анализа микрокапсул со всеми четырьмя субстанциями каротиноидов (Глава 2).

Методика была аттестована в соответствии с требованиями и подходами [114], валидационные характеристики представлены в таблицах 5.24, 5.25.

Таблица 5.24 Результаты аттестации методики анализа каротиноидов в микрокапсулах (расчет по СО)

Валидационные характеристики	Принятый критерий	Микрокапсулы с β -каротином	Микрокапсулы с ликопином	Микрокапсулы с лютеином	Микрокапсулы с астаксантином
Уравнение регрессии	_____	1,992x+0,021	1,989x+0,013	1,996x+0,005	1,976x+0,029
Линейность	$r \geq 0,98$	0,999	0,999	0,999	0,999
Правильность	RSD $\leq 3,0$ % R _{сред.} 98,0-102,0 $t_{расч.} < t_{табл} (2,57)$	0,99%	0,84%	0,65%	1,24%
		99,7	99,8	99,9	99,7
		0,48	0,33	0,27	0,77
Прецизионность (сходимость)	RSD $\leq 3,0$ %	0,85%	0,75%	0,54%	1,42%

Таблица 5.25 Результаты аттестации методики анализа каротиноидов в микрокапсулах (расчет по удельному показателю поглощения)

Валидационные характеристики	Принятый критерий	Микрокапсулы с β -каротином	Микрокапсулы с ликопином	Микрокапсулы с лютеином	Микрокапсулы с астаксантином
Уравнение регрессии	_____	1,967x+0,039	1,967x+0,041	1,973x+0,032	1,956x++0,055
Линейность	$r \geq 0,98$	0,999	0,999	0,999	0,999
Правильность	RSD $\leq 3,0$ % R _{сред.} 98,0-102,0 $t_{расч.} < t_{табл} (2,57)$	1,31%	1,35%	0,89%	1,48%
		99,7	99,7	99,8	99,6%
		0,69	0,72	0,44	0,89
Прецизионность (сходимость)	RSD $\leq 3,0$ %	1,12%	1,23%	0,93%	1,53%

Значения аттестационных параметров методики подтверждают ее валидность, на основании чего она была использована в ходе анализа стабильности каротиноидов.

В связи с тем что каротиноиды являются термолабильными соединениями, сравнительное изучение стабильности проводили в естественных условиях по методике [117].

Для получения развернутых экспериментальных данных был запланирован и проведен эксперимент по разработанной нами схеме (Таблица 5.26).

Таблица 5.26 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

При разработке плана эксперимента были учтены факторы, оказывающие влияние на стабильность каротиноидов: температура – не более 25 °С; воздействие света: хранение без доступа света и хранение на свету; упаковка: флаконы темного стекла и флаконы из бесцветного стекла. Согласно плану эксперимента предполагалось подвергнуть хранению субстанции каротиноидов, заключенные в микрокапсулы и без микрокапсулирования, для всех условий эксперимента. Отбор проб для анализа осуществляли с частотой, регламентированной [117] для естественных условий хранения (Таблица 5.27). С целью иметь математическую возможность сравнить результаты по определению стабильности каротиноидов в субстанциях и микрокапсулированном продукте, для микрокапсулированных каротиноидов рассчитывали процент содержания каротиноида от введенного в микрокапсулы.

Таблица 5.27 – Результаты определения стабильности субстанций каротиноидов и микрокапсулированных продуктов на их основе

Периодичность отбора проб, месяцы	1 А*	1 Б*	1 В**	1 Г**	2 А*	2 Б*	2 В**	2 Г**
*микрокапсулы с β-каротином на примере серии К03, **субстанция β-каротина								
0	100,00	100,02	99,60	99,60	100,00	100,02	99,60	99,60
3	100,00	100,02	99,58	99,57	100,00	100,00	96,18	95,72
6	100,01	100,00	99,59	99,57	100,00	99,99	91,44	90,27
12	100,00	100,00	99,58	99,57	100,01	99,99	84,00	82,50
18	100,01	99,99	98,47	98,17	99,99	99,99	72,99	70,63
24	99,99	99,99	97,85	97,02	99,99	99,99	56,81	53,15
30	99,99	99,98	96,77	96,61	99,89	99,88	37,60	35,94
*микрокапсулы с ликопином на примере серии ЛИ02, **субстанция ликопина								
0	100,01	100,01	99,73	99,73	100,01	100,01	99,73	99,73
3	100,00	100,00	99,74	99,73	100,00	100,00	96,03	95,81
6	100,00	100,00	99,73	99,74	100,00	99,99	92,12	91,49
12	100,00	99,99	99,70	99,69	100,00	99,99	85,37	83,70
18	100,00	99,99	98,11	98,03	99,99	99,99	73,19	71,00
24	100,00	99,99	97,50	97,17	99,99	99,99	55,68	52,83
30	99,99	99,99	96,60	96,34	99,89	99,80	35,88	33,16

Периодичность отбора проб, месяцы	1 А*	1 Б*	1 В	1 Г	2 А*	2 Б*	2 В	2 Г
*микрокапсулы с лютеином на примере серии ЛЮ01, **субстанция лютеина								
0	100,00	100,00	99,65	99,65	100,00	100,00	99,65	99,65
3	100,01	100,00	99,66	99,65	100,02	100,00	96,42	95,74
6	100,00	100,01	99,65	99,66	100,00	100,01	92,01	90,87
12	100,00	100,00	99,65	99,65	100,00	99,90	83,58	82,25
18	100,00	99,90	98,87	98,76	99,99	99,99	71,98	69,33
24	100,00	99,90	97,24	97,13	99,99	99,99	54,56	51,94
30	99,90	99,90	96,11	96,05	99,71	99,41	36,12	33,76
*микрокапсулы с астаксантином на примере серии А03, **субстанция астаксантина								
0	100,01	100,01	99,69	99,69	100,01	100,01	99,69	99,69
3	100,00	100,00	99,70	99,70	100,00	100,01	96,13	95,28
6	100,01	100,01	99,69	99,70	100,00	99,99	91,66	89,70
12	100,00	100,00	99,69	99,69	100,00	99,99	82,77	81,22
18	100,00	99,99	98,54	98,48	99,99	99,99	70,65	68,55
24	99,99	99,99	97,71	97,64	99,99	99,99	53,11	52,26
30	99,87	99,80	96,88	96,80	98,09	97,83	35,79	34,61

Исходное количественное содержание каротиноидов в субстанциях приведено в таблице 4.8 (Глава 4).

Результаты эксперимента, проведенного по предложенной матрице хранения (Таблица 5.26), подтвердили теоретические предположения о том, что микрокапсулированные каротиноиды при хранении без доступа света, во флаконах темного стекла останутся стабильными. Для всех четырех изучаемых каротиноидов группы 1А и 1Б на протяжении двух лет показали содержание до 100 % каротиноида.

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 стало уменьшаться, 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 может быть приемлемым. 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 во флаконах прозрачного стекла, хранившиеся на свету.

Эксперимент подтвердил наше предположение о том, что микрокапсулирование повысит стабильность субстанций каротиноидов и может считаться «технологическим способом» защиты этих соединений. Результаты эксперимента (Таблица 5.27) позволяют рекомендовать условия хранения для

микрокапсулированных каротиноидов, а именно в таре темного стекла или не прозрачной таре без доступа света.

Кроме того, стабильность микрокапсул с β -каротином, ликопином, лютеином и астаксантином позволяет рекомендовать технологию получения микрокапсул для ее автономной реализации с целью получения готовой лекарственной формы – микрокапсулы аналогично [357].

Положительный результат по стабилизации субстанций каротиноидов позволил считать полученные нами микрокапсулы промежуточным продуктом, который в дальнейшем может быть использован как средство доставки каротиноидов и для получения ЛФ, содержащих каротиноиды.

5.3 Получение и анализ капсул на базе микрокапсулированных субстанций каротиноидов

5.3.1 Технология получения капсул, содержащих каротиноиды

Преимущественным направлением по использованию полученных микрокапсул с каротиноидами мы сочли получение ЛФ на их базе. Наиболее простой и уже применяемой ЛФ для каротиноидов, исключающей механическое и температурное воздействия на них в процессе ее получения, являются капсулы [266-268]. 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. Нами не исключается возможность применения микрокапсул с каротиноидами в качестве самостоятельной пероральной, дозированной ЛФ.

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 (Рисунок 5.2).

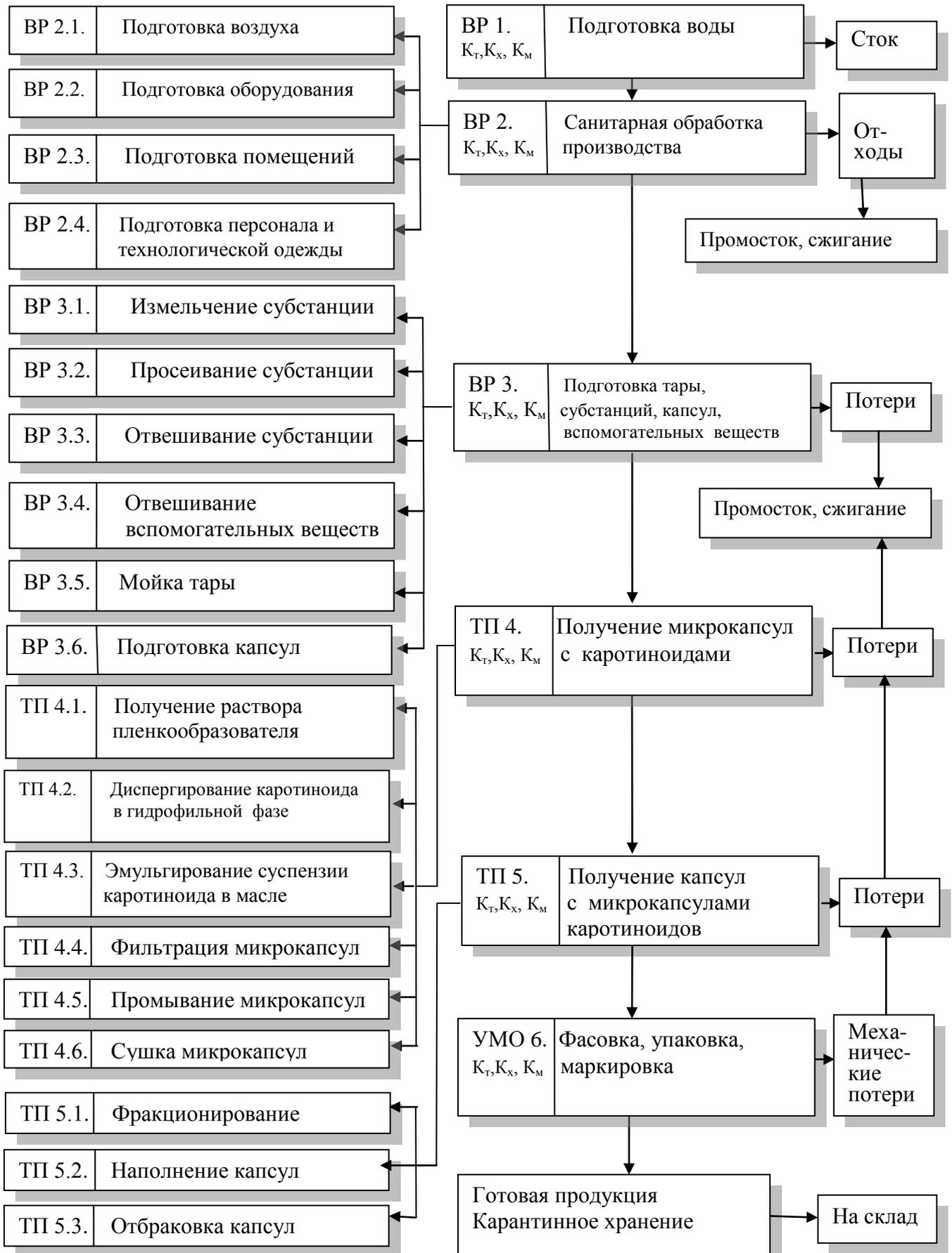


Рисунок 5.2 – Принципиальная схема производства капсул с каротиноидами

K_T, K_X и K_M – технологический, химический и микробиологический контроль

Типичная схема производства капсул с микрокапсулами каротиноидов включает три технологических этапа – вспомогательные работы (ВР), технологический процесс (ТП) и упаковку, маркировку и отгрузку готового продукта (УМО) (Рисунок 5.2).

Подготовительные работы представлены тремя группами взаимосвязанных мероприятий и дополнены стадией ВР.3.6 – подготовка капсул. Рекомендуется использовать капсулы №000.

Основной технологический процесс состоит из двух этапов: ТП.4 – получение микрокапсул с каротиноидами, которое подробно описано в разделе 5.1.2. Схема производства дополнена стадией ТП.5 – получение капсул с микрокапсулами каротиноидов, объединяющая три вида операций: ТП.5.1 – просеивание сухих микрокапсул для их равномерного фракционирования, ТП.5.2 – 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 и ТП 5.3 – отбраковка готовых капсул.

Стадия УМО идентична технологической схеме, представленной на рисунке 5.1. (раздел 5.1.2).

Для контроля качества производства капсул с микрокапсулами необходимо проводить постадийный анализ в процессе производства, а также контроль готового продукта, поэтому на следующем этапе исследования были определены показатели качества ЛФ.

В связи с тем что технология получения капсул предполагает дальнейшую ее реализацию в производственных условиях, то мы составили базовую валидационную схему (Таблица 5.28). Она включает критические параметры процесса производства капсул с микрокапсулами каротиноидов. Мы предлагаем предварительный перечень критических параметров, т.к. полная валидация процесса возможна после масштабирования технологии ЛФ, как правило, на опытно-промышленных сериях ЛС [363].

Таблица 5.28 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 показателю «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»
	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 показателю «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 плана процесса валидации при последующем его выполнении на промышленных сериях капсул. Необходимо отметить, что получение капсул с микрокапсулами каротиноидов можно рассматривать как специализированный процесс с использованием новых технологий – микрокапсулирования. Кроме того, физико-химические свойства каротиноидов, в частности их крайняя липофильность, способность к изомеризации под действием внешних факторов, могут быть причиной трудностей при адаптации технологии условиям производства. В связи с этим учет критических стадий, описанных в таблице 5.28, и осуществление контроля технологического процесса обеспечат производство продукции соответствующего качества и стабильность производственного процесса.

5.3.2 Показатели качества капсул с каротиноидами

В настоящее время качество капсул регламентировано [117] и включает следующие показатели: описание, однородность массы, подлинность, растворение, однородность дозирования, количественное определение.

Определение значений указанных параметров качества проводили согласно методикам [117].

Аналізу были подвергнуты по три серии каждой группы капсул. Усредненные результаты анализа капсул с β -каротином, ликопином, лютеином, астаксантином представлены в таблице 5.29.

Таблица 5.29 Результаты анализа капсул с микрокапсулами каротиноидов

Активный компонент капсул	Описание содержимого капсулы	Однородность массы (содержимое капсулы)	Подлинность	Распадаемость	Однородность дозирования $AV \leq L1$	Количественное определение, мг/капсулу
β-Каротин	Микрокапсулы желто-оранжевого цвета	$\bar{m}=0,211$ $\Delta m=+0,006$ $\Delta m=-0,005$	УФ-спектры поглощения испытуемого раствора и раствора СО β-каротина в области от 360 до 600 нм были идентичны	не более 30 мин	$1,2 \leq 15$	5,506
Ликопин	Микрокапсулы красного цвета	$\bar{m}=0,197$ $\Delta m=+0,004$ $\Delta m=-0,006$	УФ-спектры поглощения испытуемого раствора и раствора СО ликопина в области от 360 до 600 нм были идентичны	не более 30 мин	$1,4 \leq 15$	5,512
Лютеин	Микрокапсулы желтого цвета	$\bar{m}=0,205$ $\Delta m=+0,002$ $\Delta m=-0,003$	УФ-спектры поглощения испытуемого раствора и раствора СО лютеина в области от 360 до 600 нм были идентичны	не более 30 мин	$1,1 \leq 15$	5,497
Астаксантин	Микрокапсулы ярко-красного цвета	$\bar{m}=0,193$ $\Delta m=+0,003$ $\Delta m=-0,004$	УФ-спектры поглощения испытуемого раствора и раствора СО астаксантина в области от 360 до 600 нм были идентичны	не более 30 мин	$1,5 \leq 15$	5,435

По внешнему виду все серии капсул соответствовали следующим требованиям: твердые желатиновые капсулы белого цвета №000 [117]. В таблице 5.29 представлены данные по внешнему виду внутреннего содержимого капсул с каждым каротиноидом, который представляет собой микрокапсулы желто-оранжевого (β -каротин), красного (ликопин), желтого (лютеин) и ярко-красного цвета (астаксантин).

В соответствии с ГФ XIII [117] при определении средней массы капсулы допустимое отклонение не превысило $\pm 10\%$.

Подлинность капсул определяли методом спектрофотометрии, используя раствор, приготовленный для количественного определения. Для всех проанализированных серий капсул результат был положительный (Таблица 5.29).

В связи с тем что среднее содержание активного компонента в одной капсуле должно составлять 5 мг, определение однородности дозирования проводили по способу 1 [117], используя методику, приведенную в главе 2.

С учетом требований ГФ XIII [117] и результатов анализа серий капсул с каротиноидами был определен перечень показателей качества капсул с β -каротином, ликопином, лютеином и астаксантином: описание, однородность массы содержимого капсул, подлинность, распадаемость, однородность дозирования, количественное определение.

Изучение стабильности микрокапсул по предложенной нами схеме хранения (Таблица 5.26) позволило определить упаковку капсул: широкогорлые флаконы темного стекла.

С соблюдением этих условий было проведено определение стабильности капсул с микрокапсулами каротиноидов (Таблицы 5.30 – 5.33).

Таблица 5.30 Результаты определения срока годности капсул с β -каротином

Показатель качества	Исходный образец	Периодичность отбора проб и проведения анализа					
		3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	18 месяцев	24 месяца	30 месяцев
Внешний вид, описание содержимого капсул	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы желто-оранжевого цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы желто-оранжевого цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы желто-оранжевого цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы желто-оранжевого цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы желто-оранжевого цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы желто-оранжевого цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы желто-оранжевого цвета
Однородность массы	$\bar{m}=0,211$ $\Delta m=+0,006$ $\Delta m=-0,005$						
Подлинность	соответствует						
Распадаемость	22	23	23	23	23	22	22
Однородность дозирования	$1,2 \leq 15$	$1,2 \leq 15$	$1,2 \leq 15$	$1,3 \leq 15$	$1,2 \leq 15$	$1,2 \leq 15$	$1,2 \leq 15$
Микро-биологическая чистота	категория 3.Б соответствует	категория 3.Б не соответствует					
Количественное определение	5,506	5,506	5,505	5,505	5,505	5,505	5,504

Таблица 5.31 Результаты определения срока годности капсул с ликопином

Показатель качества	Исходный образец	Периодичность отбора проб и проведения анализа					
		3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	18 месяцев	24 месяца	30 месяцев
Внешний вид, описание содержимого капсул	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы красного цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы красного цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы красного цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы красного цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы красного цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы красного цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы красного цвета
Однородность массы	$\bar{m}=0,197$ $\Delta m=+0,004$ $\Delta m=-0,006$						
Подлинность	соответствует						
Распадаемость	24	24	23	23	23	23	23
Однородность дозирования	$1,4 \leq 15$	$1,4 \leq 15$	$1,6 \leq 15$	$1,5 \leq 15$	$1,4 \leq 15$	$1,4 \leq 15$	$1,4 \leq 15$
Микро-биологическая чистота	категория 3.Б соответствует	категория 3.Б не соответствует					
Количественное определение	5,512	5,512	5,512	5,511	5,511	5,511	5,511

Таблица 5.32 Результаты определения срока годности капсул с лютеином

Показатель качества	Исходный образец	Периодичность отбора проб и проведения анализа					
		3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	18 месяцев	24 месяца	30 месяцев
Внешний вид, описание содержимого капсул	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы желтого цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы желтого цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы желтого цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы желтого цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы желтого цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы желтого цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы желтого цвета
Однородность массы	$\bar{m}=0,205$ $\Delta m=+0,002$ $\Delta m=-0,003$						
Подлинность	соответствует						
Распадаемость	23	23	23	23	24	24	24
Однородность дозирования	$1,1 \leq 15$	$0,99 \leq 15$	$1,1 \leq 15$	$1,1 \leq 15$	$1,0 \leq 15$	$1,1 \leq 15$	$1,1 \leq 15$
Микро-биологическая чистота	категория 3.Б соответствует	категория 3.Б не соответствует					
Количественное определение	5,508	5,508	5,508	5,508	5,508	5,507	5,507

Таблица 5.33 Результаты определения срока годности капсул с астаксантином

Показатель качества	Исходный образец	Периодичность отбора проб и проведения анализа					
		3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	18 месяцев	24 месяца	30 месяцев
Внешний вид, описание содержимого капсул	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы ярко-красного цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы ярко-красного цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы ярко-красного цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы ярко-красного цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы ярко-красного цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы ярко-красного цвета	твердые желатиновые капсулы белого цвета, №000. микрокапсулы ярко-красного цвета
Однородность массы	$\bar{m}=0,193$ $\Delta m=+0,003$ $\Delta m=-0,004$						
Подлинность	соответствует						
Распадаемость	22	22	23	23	23	23	23
Однородность дозирования	$1,5 \leq 15$	$1,5 \leq 15$	$1,5 \leq 15$	$1,6 \leq 15$	$1,5 \leq 15$	$1,5 \leq 15$	$1,5 \leq 15$
Микро-биологическая чистота	категория 3.Б соответствует	категория 3.Б не соответствует					
Количественное определение	5,495	5,495	5,494	5,494	5,494	5,493	5,493

Как показано в таблицах 5.30 – 5.33, серии капсул с β -каротином, ликопином, лютеином, астаксантином в процессе определения стабильности анализировались по следующим показателям: внешний вид, описание содержимого капсул, однородность массы, подлинность, распадаемость, однородность дозирования, количественное определение.

Результаты эксперимента показали, что внешний вид капсул и их содержимого для всех проанализированных серий не изменился на протяжении всего эксперимента.

При определении подлинности образцов, подвергнутых хранению, результат был положительный для всех изученных образцов.

В течение всего срока хранения результаты определения однородности массы капсул соответствовали значению нормы, регламентируемой ГФ XIII [117], и не превысили 10 %.

Определение распадаемости капсул показало, что капсулы всех изученных серий распадались в воде очищенной при температуре 37 °С менее, чем за 30 мин, что соответствует требованиям ГФ XIII, предъявляемым к капсулам [117].

Показатели «Однородность дозирования» и «Микробиологическая чистота» оставались в пределах нормы в течение всего эксперимента.

Количественное содержание каротиноидов в капсулах в процессе хранения не изменилось.

Показатель «Микробиологическая чистота» оставался в пределах нормы в течение 24 месяцев. Контроль капсул по этому параметру через 30 месяцев хранения показал несоответствие требованиям ГФ XIII [117].

Таким образом, в течение 24 месяцев естественного хранения капсул с микрокапсулами β -каротина, ликопина, лютеина и астаксантина все показатели для микрокапсул с четырьмя каротиноидами оказались в пределах нормы.

На основании полученных результатов и требований ГФ XIII [117] для изученных капсул с микрокапсулами каротиноидов был определен первичный срок годности 2 года.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 5

На основании теоретических данных и результатов эксперимента в качестве способа стабилизации субстанций каротиноидов предложено микрокапсулирование.

Проведенная сравнительная оценка методов микрокапсулирования позволяет считать, что наиболее эффективным является способ, в основе которого лежит принцип «диспергирования в несмешивающейся жидкости».

Экспериментально определена оптимальная область технологических параметров для получения микрокапсул с модельными субстанциями каротиноидов (β -каротином, ликопином, лютеином, астаксантином): температурный режим – 40 °С, дисперсионная среда – масло подсолнечное, соотношение полимер:масло – 1:3. Предложена технологическая схема получения микрокапсул с модельными каротиноидами.

Разработана матрица хранения субстанций каротиноидов в нативном и микрокапсулированном виде, учитывающая влияние факторов внешней среды.

Изучена стабильность модельных каротиноидов в условиях естественного хранения. Установлен срок стабильности микрокапсулированных субстанций каротиноидов – 2 года.

Предложена технологическая схема получения твердых желатиновых капсул с микрокапсулированными модельными субстанциями каротиноидов, включающая в качестве одной из технологических операций стадию микрокапсулирования.

Микрокапсулирование каротиноидов может быть реализовано как самостоятельный технологический процесс, так и в совокупности с получением твердых желатиновых капсул. Кроме того, микрокапсулы с каротиноидами могут быть использованы для введения в любую приемлемую для этих соединений лекарственную форму.

Предложены показатели качества капсул с микрокапсулированными каротиноидами: внешний вид, описание содержимого капсул, однородность

массы, подлинность, распадаемость, однородность дозирования, микробиологическая чистота, количественное определение.

Результат эксперимента подтвердил предположение о том, что практическим выходом этого этапа исследования являются стабильные субстанции каротиноидов, способ их стабилизации и оптимальная ЛФ – капсулы. Это согласуется с выходом блока А3 рисунка 2.4 (Глава 2) и как положительный практический фактор (вход блока А5) может быть использован при построении методологии создания ЛФ на основе каротиноидов в нотации IDEF0.

ГЛАВА 6 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБОВ АНАЛИЗА И ТЕХНОЛОГИИ ОБЛЕПИХОВОГО МАСЛА

Облепиховое масло производится отечественной фармацевтической промышленностью с 1970 г. Более чем за 40-летний период применения оно зарекомендовало себя как одно из основных и востребованных ранозаживляющих ЛС природного происхождения [260]. Высокий спрос на облепиховое масло и его лекарственные формы отмечается как врачами, так и потребителями [266, 267].

В связи с этим остается актуальным вопрос совершенствования технологии получения облепихового масла, что предполагает проведение сравнительного анализа образцов этого ЛС, полученных по отличающимся технологиям. Аналитический фрагмент этого исследования невозможен без разработки новых и оптимизации уже существующих методик анализа каротиноидов облепихового масла.

Кроме того, проведение этой части экспериментального модуля – блок А4 диаграммы декомпозиции дизайна исследования (Рисунок 2.4, Глава 2) дает возможность более обоснованно провести моделирование обобщенной методологии в нотации IDEF0, т.к. предложенные в главе 4 методики и аналитические подходы будут применены к исследованию и совершенствованию анализа ЛС с каротиноидами, уже зарегистрированного в РФ [260].

6.1 Исследование каротиноидного состава облепихового масла

С целью выбора предпочтительной технологии и совершенствования анализа облепихового масла проведены сравнительные исследования пяти образцов этого ЛС. Для изучения каротиноидного состава осуществлено выделение этих БАВ и разделение по разработанной ранее схеме, представленной в главе 3. Экспериментальная часть была проведена с образцами облепихового масла «вслепую». Особенности технологии получения образцов (Глава 2) были раскрыты производителем на этапе обсуждения результатов эксперимента.

Облепиховое масло, кроме каротиноидов, содержит высшие жирные кислоты (олеиновую, линолевую, линоленовую, пальмитиновую, пальмитолеиновую) аскорбиновую кислоту, сахара, спирты (манит, сорбит, ксилит), органические кислоты (яблочную, лимонную, винную, янтарную), токоферол, стерины (холестерин, ситостерин), аминокислоты. В этой связи для очистки экстрактов предварительно необходимо было провести омыление. Мы сочли целесообразным обрабатывать реакционную смесь полярными растворителями водой или спиртом этиловым. По данным источников [364-367] масло, полученное из семян, содержит около 40 % ненасыщенных жирных кислот, тогда как из плодов – только 20 %, что тоже может служить дополнительным параметром определения качества продукции.

В соответствии с методикой, приведенной в главе 2, были получены фракции каротиноидов облепихового масла и проанализированы методом ВЭЖХ (разделы 2.2 и 4.3). Для каждого хроматографического пика измеряли спектр в диапазоне от 400 до 500 нм, который специфичен для каротиноидов (Рисунок 6.1, Таблица 6.1).

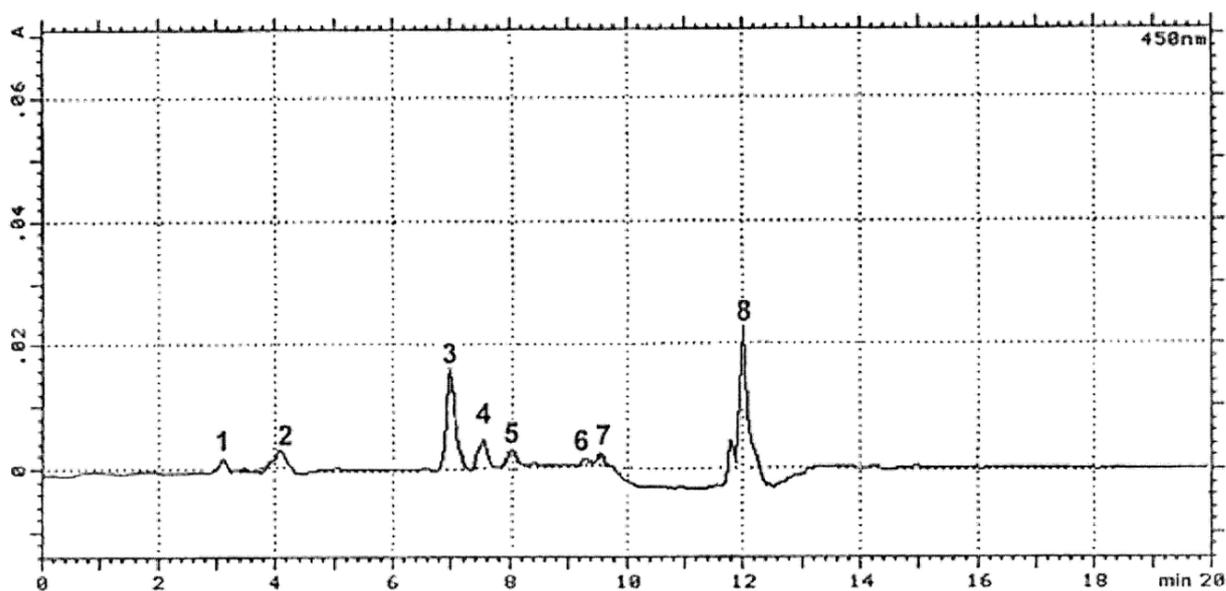


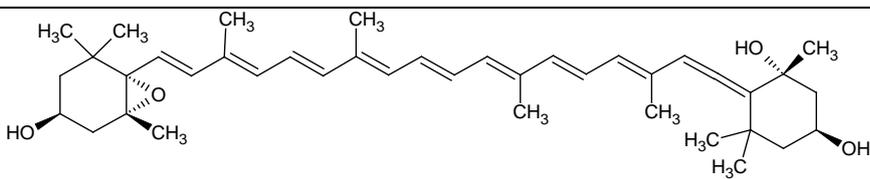
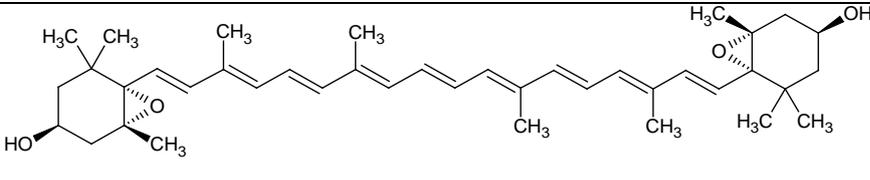
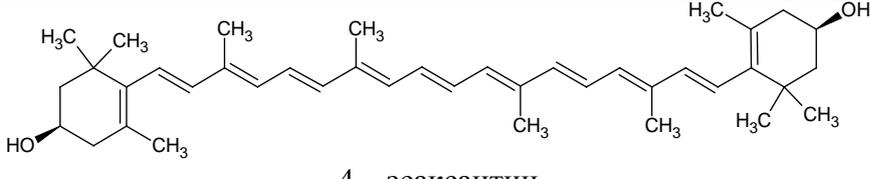
Рисунок 6.1 – Типовая ВЭЖХ хроматограмма образца облепихового масла

Таблица 6.1 Результаты анализа образца №1 облепихового масла

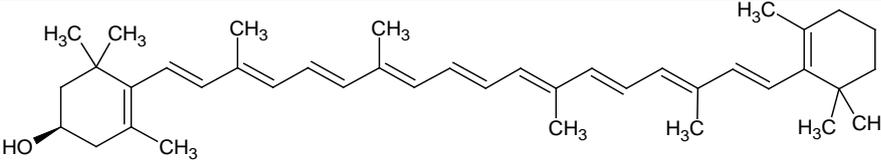
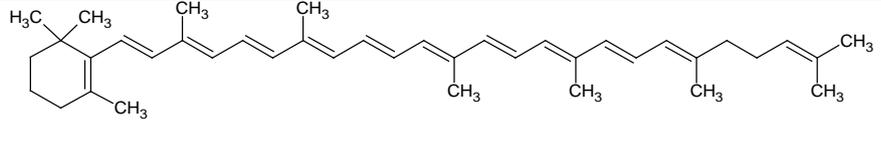
Время удерживания, t мин	Максимумы поглощения, нм	Расчетное значение (Ш/П), %	Процентное содержание, %	Соединение и его номер пика на хроматограмме
3,15	415, 440, 469	88,8	1,5	неидентифицированное – 1
4,02	414, 438, 467	88,9	2,4	неидентифицированное – 2
6,89	421, 445, 474	60,4	33,1	лютеин – 3
7,49	452, 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	β-каротин – 8

Для неидентифицированных каротиноидов были проведены исследования с помощью хромато-масс-спектрометрии. Предварительно были рассчитаны наиболее значимые фрагменты для идентификации неизвестных каротиноидов по базе данных [312] (Таблица 6.2).

Таблица 6.2 Результаты анализа облепихового масла методом хромато-масс-спектрометрии

Номер пика неидентифицированного каротиноида на хроматограмм, формула каротиноида	Экспериментальные значения, m/z	Расчетные значения, m/z
 <p>1 – неоксантин</p>	600,824; 582,926; 565,002; 508,978; 490,976; 220,889; 166,889	601, 583, 565, 509, 491, 221, 167
 <p>2 – виолаксантин</p>	600,835; 582,929; 564,993; 508,991; 491,011; 232,561; 93,102	601, 583, 565, 509, 491, 232, 93
 <p>4 – зеаксантин</p>	568,023; 550,254; 532,219; 488,879; 409,787	568, 550, 532, 489, 410

Продолжение таблицы 6.2

 <p style="text-align: center;">6 – β-криптоскантин</p>	552,782; 534,515; 460,417; 442,188; 105,002	552, 534, 460, 442, 105
 <p style="text-align: center;">7 – γ-каротин</p>	536,865; 444,122; 430,237; 255,198; 177,456	536, 444, 430, 255, 177

Сопоставляя полученные данные с табличными [55, 116] и собственными расчетными значениями, мы установили, что соединение с временем удерживания 3,15 – неоксантин, 4,02 – виолаксантин, 7,49 – зеаксантин, 9,35 – β-криптоскантин, 9,63 – γ-каротин.

Наиболее сложным моментом в анализе стала идентификация неоксантина и виолаксантина. Эти соединения имеют одинаковые молекулярные массы и крайне близкие структуры, т.к. они являются структурными изомерами (Таблица 6.2). В данном случае наиболее информативными являются значение масс специфичных фрагментов с молекулярными массами менее 300 (Таблица 6.2), т.к. более «крупные осколки» для обоих соединений имеют одинаковую структуру. Идентификация трех других соединений не вызвала затруднений, т.к. они не являются изомерами между собой.

Таким образом, установлен каротиноидный состав образца облепихового масла, полученного по экспериментальной технологии производства ЗАО «Вифитех». Образец содержит 43,1 % β-каротина, 33,1 % лютеина, 12,4 % зеаксантина, 2,4 % виолаксантина и 1,5 % неоксантина.

Следует подчеркнуть, что определение качества облепихового масла по содержанию каротиноидов методом хромато-масс-спектрометрии, безусловно, является наиболее информативным и доказательным, однако это достаточно дорогой с позиций оснащенности метод, длительный в исполнении и требующий особой квалификации персонала. Его оптимально использовать на этапе научной

разработки ЛС, содержащих каротиноиды, что показано на примере облепихового масла.

В связи с вышеизложенным нами была рассмотрена возможность применения методов УФ-спектрофотометрии и ТСХ для сравнительной оценки каротиноидного состава пяти образцов облепихового масла (Глава 2).

6.2 Использование метода УФ-спектрофотометрии в анализе образцов облепихового масла

Доминантной группой БАВ плодов облепихи являются каротиноиды, содержание которых колеблется от 10 до 20 мг% (плоды свежие) и от 40 до 70 мг% (плоды сухие). Преобладающим соединением и в плодах облепихи, и в облепиховом масле является β -каротин, что позволяет определять подлинность и суммарное содержание суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин, как это и практикуют основные производители этого ЛС.

Действующая НД «Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения» ЗАО «Алтайвитамины» Р №000245/02-260312 [368] предписывает проводить анализ суммы каротиноидов в гексановом извлечении из препарата при аналитической длине волны 450 нм и использовать величину удельного показателя поглощения 2592.

В соответствии с требованиями «Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения» ЗАО «Вифитех» ЛП 002408-210314 [369] определение суммы каротиноидов в препарате следует проводить в растворе петролейного эфира, аналитическая длина волны – 450 нм, удельный показатель поглощения – 2400.

По данным источников [55, 116, 131] спектры поглощения β -каротина в н-гексане и петролейном эфире должны иметь максимумы поглощения при 425, 450, 477 нм. Для обоих растворителей и длины волны 450 нм табличным значением удельного показателя поглощения является величина 2592.

Идентификацию β -каротина в образцах проводили по положениям максимумов полос поглощения, используя растворы образцов в н-гексане и петролейном эфире, как регламентируют НД на эти ЛС [368, 369].

Для расчета содержания суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин в процентах в анализируемых образцах использовали величину удельного показателя поглощения – 2592 для растворов в н-гексане [55, 130, 151]. Параллельно рассчитывали суммарное содержание каротиноидов в анализируемых образцах с использованием СО β -каротина.

Для расчета суммарного содержания каротиноидов в образцах облепихового масла (растворитель – петролейный эфир) использовали два значения удельного показателя светопоглощения – 2400 [369] и 2592 [368], кроме того, параллельно проводили расчет с использованием СО β -каротина.

По результатам пилотных испытаний было установлено, что спектры поглощения образцов облепихового масла №1, №4, №5 имеют каротиноидный профиль. В спектрах поглощения растворов образцов № 2, 3 облепихового масла максимумов полос поглощения, присущих каротиноидам, зафиксировано не было. Образец №2 избирательно поглощает в аналитической области, но характерного для каротиноидов профиля спектра прямой спектрофотометрией получить не удалось.

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, поскольку образец масла получен экстракцией метиленхлоридом шрота плодов облепихи. Предположительно, чувствительность метода не позволяет идентифицировать каротиноидный профиль спектра поглощения. Возможно, что этот образец представляет собой суммарный экстракт, содержащий вещества различной структуры, что сказывается на спектре поглощения.

6.2.1 Анализ образцов облепихового масла, полученных по отличающимся технологиям и различными производителями (растворитель – н-гексан)

Принимая во внимание результаты предварительных испытаний, мы провели сравнительный анализ образцов облепихового масла. Для всех образцов облепихового масла была выбрана оптимальная схема разведения в н-гексане с минимальным количеством этапов (Глава 2).

Установлено, что спектр поглощения раствора образца облепихового масла № 1 в н-гексане имеет три максимума поглощения при 425, 446, 468 нм (Рисунок 6.2), которые соответствуют максимумам производных каротина [55, 116, 130].

Результаты определения количественного содержания суммы каротиноидов в образце облепихового масла №1 представлены в таблице 6.3.

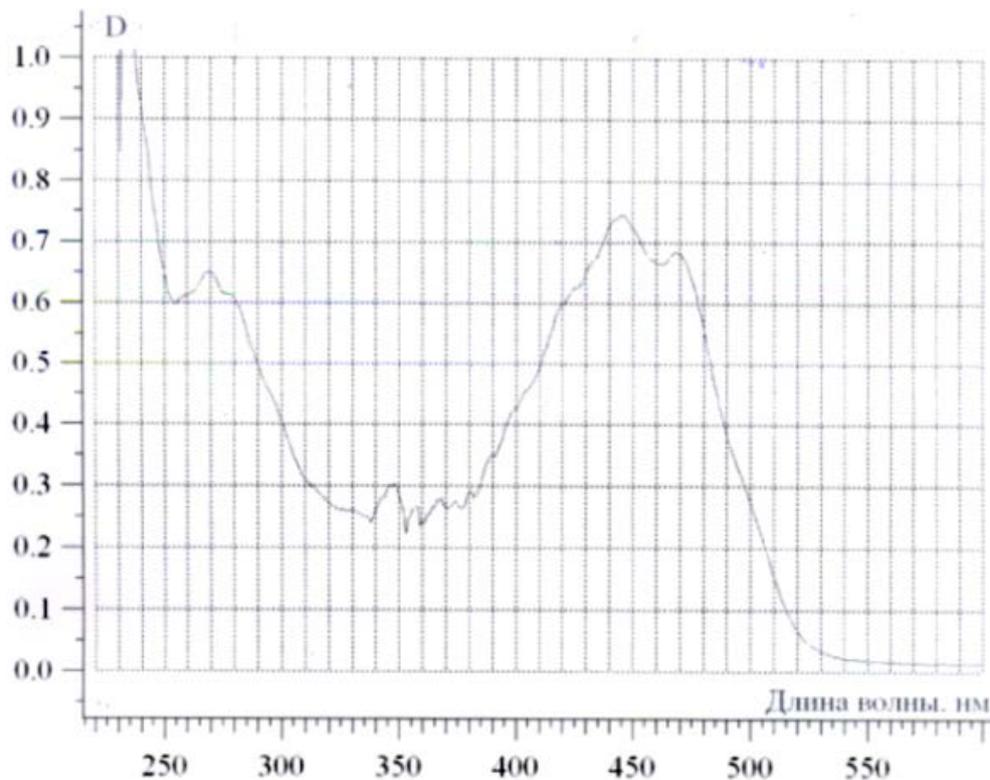


Рисунок 6.2 – Спектр поглощения раствора образца №1 облепихового масла в н-гексане

Таблица 6.3 Количественное содержание суммы каротиноидов в образце облепихового масла №1

Оптическая плотность	Расчет по удельному показателю поглощения β -каротина в н-гексане		Расчет с применением СО β -каротина	
	количественное содержание, %	метрологические характеристики	количественное содержание, %	метрологические характеристики
0,744	0,287	$\bar{x} = 0,287$ $S\bar{x} = 0,002323$ $\Delta X = 0,005971$ $\epsilon\% = 2,08\%$	0,269	$\bar{x} = 0,270$ $S\bar{x} = 0,002232$ $\Delta X = 0,005736$ $\epsilon\% = 2,13\%$
0,753	0,290		0,273	
0,724	0,279		0,262	
0,739	0,285		0,267	
0,740	0,285		0,268	
0,767	0,296		0,278	

Из данных таблицы 6.3 следует, что в образце облепихового масла №1, полученного с применением в качестве экстрагента метилхлорида в производственных условиях ЗАО «Вифитех», содержится около 0,3 % каротиноидов в пересчете на β -каротин. При этом среднее содержание каротиноидов в образце облепихового масла №1, рассчитанное по удельному показателю поглощения, составляет 0,287 %; аналогичный показатель с применением СО β -каротина находится около 0,270 %. Относительная погрешность определения для обоих способов расчета соответствует 2,0 %.

Предварительные результаты исследования образца облепихового масла №2, полученного экстракцией плодов облепихи растительным маслом, показали, что в спектре поглощения раствора этого образца в аналитической области от 400 до 550 нм характерные максимумы оптической плотности не зафиксированы (Рисунок 6.3).

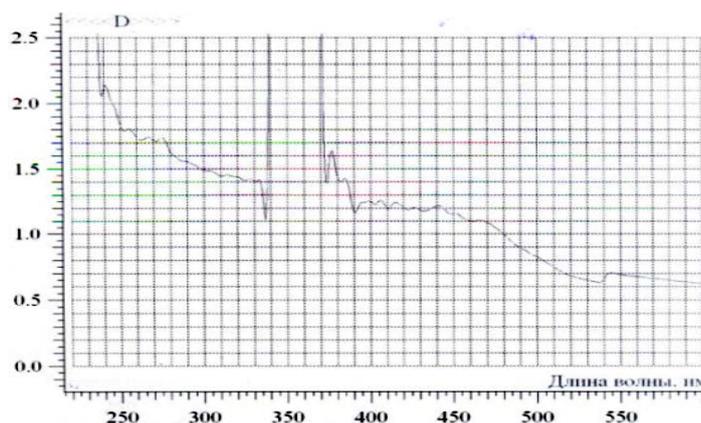


Рисунок 6.3 – Спектр поглощения раствора образца облепихового масла №2

Для дальнейшего анализа и регистрации электронного спектра с выраженными максимумами поглощения в качестве раствора сравнения использовали раствор растительного масла в н-гексане, т.е. применили вариант дифференциальной спектрофотометрии (Глава 2).

На дифференциальном спектре раствора в аналитической области длин волн от 400 до 550 нм установлены максимумы поглощения при 449, 475 нм и плечо в области 426 нм (Рисунок 6.4), что характеризует профиль спектра как каротиноидный.

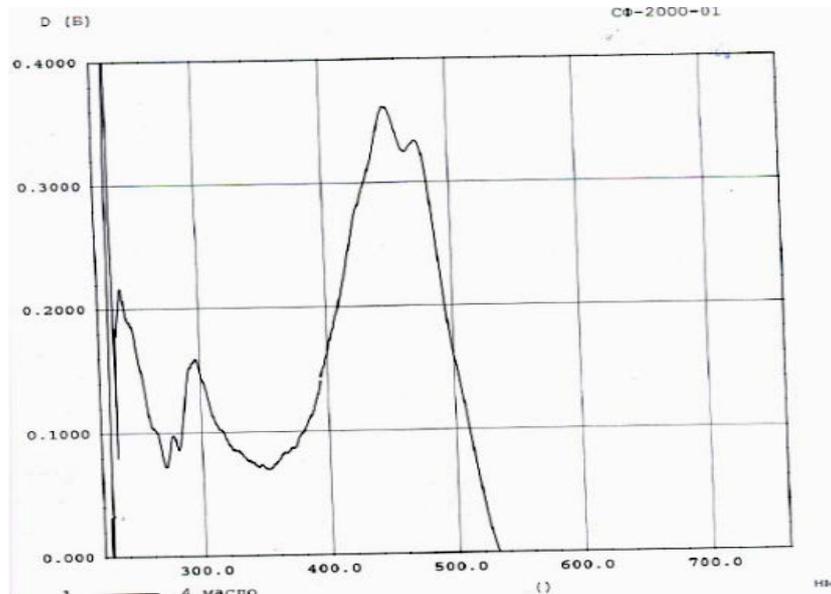


Рисунок 6.4 – Дифференциальный спектр поглощения раствора образца облепихового масла №2

Результаты определения количественного содержания суммы каротиноидов в образце облепихового масла №2 представлены в таблице 6.4

Таблица 6.4 Количественное содержание суммы каротиноидов в образце облепихового масла №2

Оптическая плотность	Расчет по удельному показателю поглощения β -каротина в н-гексане		Расчет с применением СО β -каротина	
	количественное содержание, %	метрологические характеристики	количественное содержание, %	метрологические характеристики
0,360	0,139	$\bar{x} = 0,139$ $S\bar{x} = 0,000422$ $\Delta X = 0,001083$ $\varepsilon\% = 0,78\%$	0,130	$\bar{x} = 0,130$ $S\bar{x} = 0,000401$ $\Delta X = 0,001031$ $\varepsilon\% = 0,79\%$
0,356	0,137		0,129	
0,361	0,139		0,131	
0,362	0,139		0,131	
0,357	0,138		0,129	
0,364	0,140		0,131	

Полученные данные позволяют констатировать, что для анализа суммы каротиноидов в образце облепихового масла №2, полученного с использованием в качестве экстрагента растительного масла, следует использовать дифференциальный вариант спектрофотометрии. Среднее суммарное содержание каротиноидов в образце №2 при использовании удельного показателя поглощения составляет 0,139 % каротиноидов в пересчете на β -каротин. Расчеты суммарного содержания каротиноидов относительно СО β -каротина показали меньшее содержание – 0,130 %.

Изучение образца облепихового масла №4 показало, что спектр поглощения его раствора в н-гексане характеризуется тремя максимума поглощения при 424, 446, 468 нм (Рисунок 6.5).

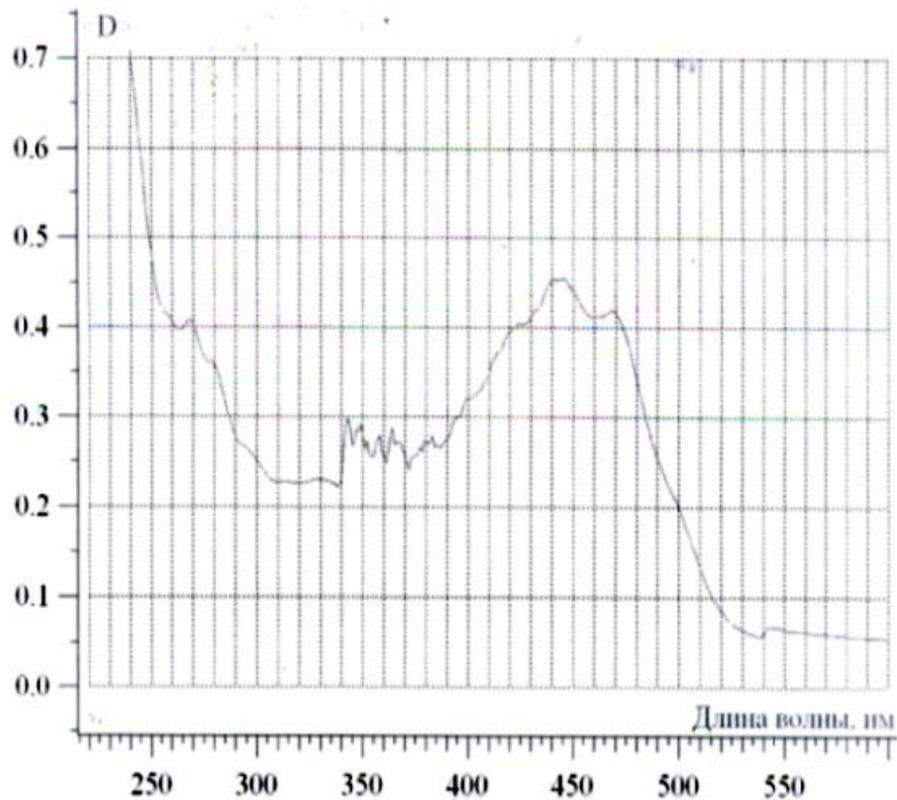


Рисунок 6.5 – Спектр поглощения раствора образца облепихового масла №4

Результаты определения количественного содержания суммы каротиноидов в этом образце представлены в таблице 6.5.

Таблица 6.5 Содержание суммы каротиноидов в образце облепихового масла №4

Оптическая плотность	Расчет по удельному показателю поглощения β -каротина в н-гексане		Расчет по СО β -каротина	
	количественное содержание, %	метрологические характеристики	количественное содержание, %	метрологические характеристики
0,512	0,198	$\bar{x} = 0,193$ $S\bar{x} = 0,001626$ $\Delta X = 0,004178$ $\varepsilon\% = 2,17\%$	0,185	$\bar{x} = 0,181$ $S\bar{x} = 0,001522$ $\Delta X = 0,003911$ $\varepsilon\% = 2,17\%$
0,487	0,188		0,176	
0,509	0,196		0,184	
0,495	0,191		0,179	
0,503	0,194		0,182	
0,490	0,189		0,177	

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что в образце облепихового масла №4, полученного в условиях производства ЗАО «Алтайвитамины», содержится в среднем 0,193 % каротиноидов в пересчете на β -каротин, что в 1,5 раза меньше, чем в образце облепихового масла №1. Содержание каротиноидов, рассчитанное с применением СО β -каротина, составляет около 0,180 %, что также в 1,5 раза меньше, чем в образце облепихового масла №1. Относительная погрешность определения для обоих способов расчета составила около 2,2 %. При этом содержание суммы каротиноидов в промышленном образце облепихового масла ЗАО «Алтайвитамины» соответствует требованиям НД Р №000245/02-260312 (не менее 0,180 %) [368].

Таким образом, экспериментальный образец облепихового масла, полученный в результате экстракции плодов облепихи метиленхлоридом (образец №1), и полученный экстракцией сырья растительным маслом (образец №2), превосходят промышленный образец облепихового масла ЗАО «Алтайвитамины» по суммарному содержанию каротиноидов.

В результате изучения промышленного образца облепихового масла ЗАО «Вифитех» (образец №5), установлено, что в спектре поглощения его раствора в н-гексане имеются три полосы поглощения с максимумами при 426, 448, 472 нм (Рисунок 6.6).

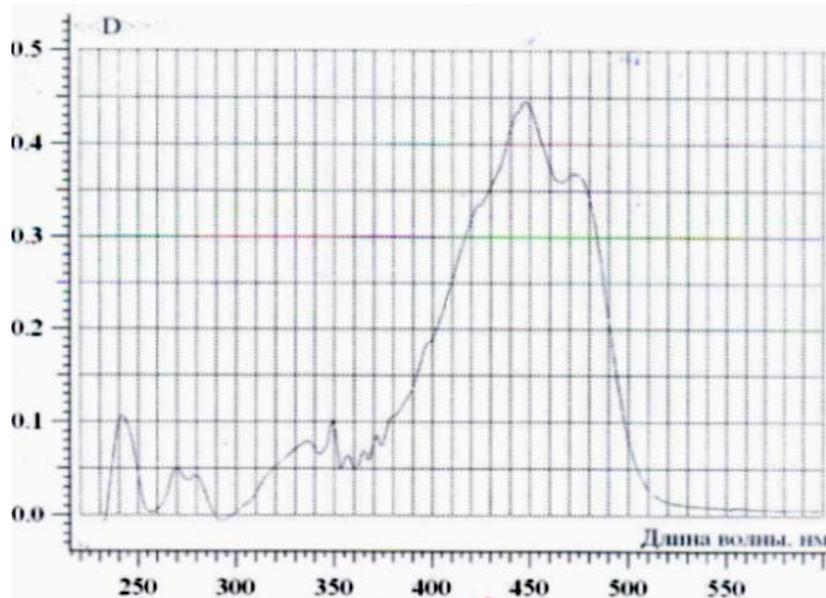


Рисунок 6.6 – Спектр поглощения раствора образца облепихового масла №5
 Результаты определения количественного содержания суммы каротиноидов
 в образце облепихового масла №5 представлены в таблице 6.6.

Таблица 6.6 Содержание суммы каротиноидов в образце облепихового масла №5

Оптическая плотность Образцов	Расчет по удельному показателю поглощения β -каротина в н-гексане		Расчет с применением CO β -каротина	
	количественное содержание, %	метрологические характеристики	количественное содержание, %	метрологические характеристики
0,486	0,189	$\bar{x} = 0,192$ $S\bar{x} = 0,001437$ $\Delta X = 0,003694$ $\varepsilon\% = 1,92\%$	0,176	$\bar{x} = 0,180$ $S\bar{x} = 0,00146$ $\Delta X = 0,003753$ $\varepsilon\% = 2,08\%$
0,500	0,193		0,181	
0,511	0,197		0,185	
0,491	0,189		0,178	
0,489	0,189		0,177	
0,506	0,195		0,183	

На основании проведенного исследования можно сделать вывод о том, что в промышленном образце облепихового масла ЗАО «Вифитех» (образец №5), полученного по традиционной технологии, содержится в среднем 0,192 % каротиноидов в пересчете на β -каротин, что соответствует требованиям НД ЛП 002408-210314 (не менее 0,180 %) [369]. Следует отметить, что образец облепихового масла №5 содержит каротиноидов в 1,4 раза меньше, чем экспериментальный образец облепихового масла №1. Сравнение суммарного

содержания каротиноидов в промышленном и экспериментальном образцах показало, что экспериментальный образец облепихового масла №2, полученный с использованием растительного масла, уступает по содержанию каротиноидов промышленному образцу №5.

Определение суммарного содержания каротиноидов в образце №5 с применением СО β-каротина показало, что найденная величина также соответствует норме содержания каротиноидов в образце по НД ЛП 002408-210314 (не менее 0,180 %) [368], хотя результат несколько занижен (0,180 %) в сравнении с расчетом по удельному показателю поглощения.

Необходимо отметить, что среднее содержание каротиноидов в промышленных образцах облепихового масла ЗАО «Алтайвитамины» (образец №4) и ЗАО «Вифитех» (образец №5) находится на одном уровне и составляет 0,193 % и 0,192 % соответственно.

Таким образом, максимальное суммарное содержание каротиноидов в пересчете на β-каротин – 0,287 % установлено для экспериментального образца облепихового масла №1, полученного экстракцией метилхлоридом плодов облепихи в условиях производства ЗАО «Вифитех».

Содержание каротиноидов в образце №4 – промышленный образец облепихового масла ЗАО «Алтайвитамины» и в образце №5 – промышленный образец облепихового масла ЗАО «Вифитех» соответствует требованиям НД этих предприятий [368, 369].

Наименьшее содержание каротиноидов – 0,139 % было определено в экспериментальном образце облепихового масла №2, полученного с использованием растительного масла.

Важно отметить, что соотношение суммарного содержания каротиноидов с применением СО β-каротина относительно расчета по удельному показателю поглощения сохраняется, несмотря на то что результаты в первом варианте расчета несколько занижены.

6.2.2 Анализ образцов облепихового масла, полученных по отличающимся технологиям, разными производителями (растворитель – петролейный эфир)

В связи с тем что вторым растворителем, который широко пользуются в анализе облепихового масла, является петролейный эфир, были проведены исследования методик количественного определения каротиноидов в пересчете на β -каротин с применением этого растворителя.

В ходе анализа установлено, что в спектре поглощения раствора образца №1 в петролейном эфире имеются две интенсивные полосы с максимумами поглощения при 452, 476 нм и плечо при 424-426 нм (Рисунок 6.7).

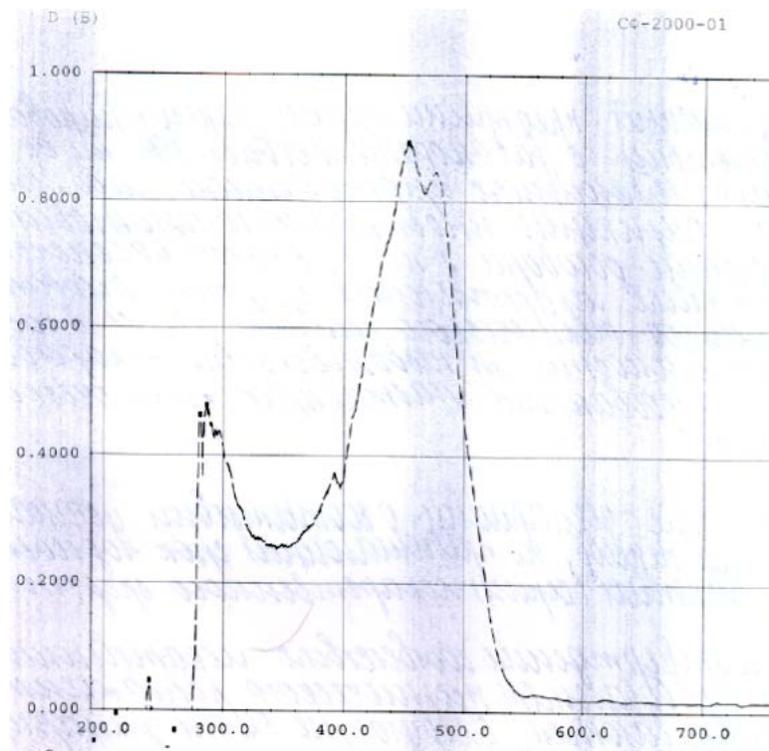


Рисунок 6.7 – Спектр поглощения раствора образца облепихового масла №1

Результаты определения количественного содержания суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин в образце облепихового масла №1 представлены в таблице 6.7.

Таблица 6.7 Содержание суммы каротиноидов в образце облепихового масла №1

Опти- ческая плот- ность	Расчет по удельному показателю поглощения β-каротина – 2400		Расчет по удельному показателю поглощения β-каротина – 2592		Расчет с применением СО β-каротина	
	коли- чествен- ное содержа- ние, %	метрологи- ческие характерис- тики	коли- чествен- ное содержа- ние, %	метрологи- ческие характерис- тики	коли- чествен- ное содержа- ние, %	метрологи- ческие характерис- тики
0,893	0,370	$\bar{x} = 0,363$ $S\bar{x} = 0,002603$ $\Delta X = 0,006689$ $\varepsilon\% = 1,84\%$	0,343	$\bar{x} = 0,334$ $S\bar{x} = 0,003392$ $\Delta X = 0,008718$ $\varepsilon\% = 2,61\%$	0,305	$\bar{x} = 0,230$ $S\bar{x} = 0,002027$ $\Delta X = 0,00521$ $\varepsilon\% = 1,74\%$
0,892	0,370		0,342		0,305	
0,884	0,367		0,339		0,302	
0,859	0,356		0,330		0,294	
0,864	0,358		0,322		0,295	
0,867	0,359		0,330		0,297	

Установлено, что в образце облепихового масла №1, полученного в производственных условиях ЗАО «Вифитех» с применением в качестве экстрагента метилхлорида, содержится около 0,360% каротиноидов при расчете с применением удельного показателя поглощения β-каротина – 2400. Аналогичный расчет, но с использованием величины удельного показателя – 2592 показал, что этот образец содержит около 0,330 % суммы каротиноидов. Количественное содержание суммы каротиноидов в пересчете на СО β-каротина составило – 0,230 %.

Полученные данные согласуются с результатами анализа образца облепихового масла №1 для растворов в н-гексане (около 0,300 %).

Предварительные испытания образца облепихового масла №2, полученного с помощью экстракции каротиноидов растительным маслом, показали, что для анализа этого образца более целесообразно применять вариант дифференциальной спектрофотометрии (Глава 2).

Дифференциальный спектр поглощения раствора образца облепихового масла представлен на рисунке 6.8.

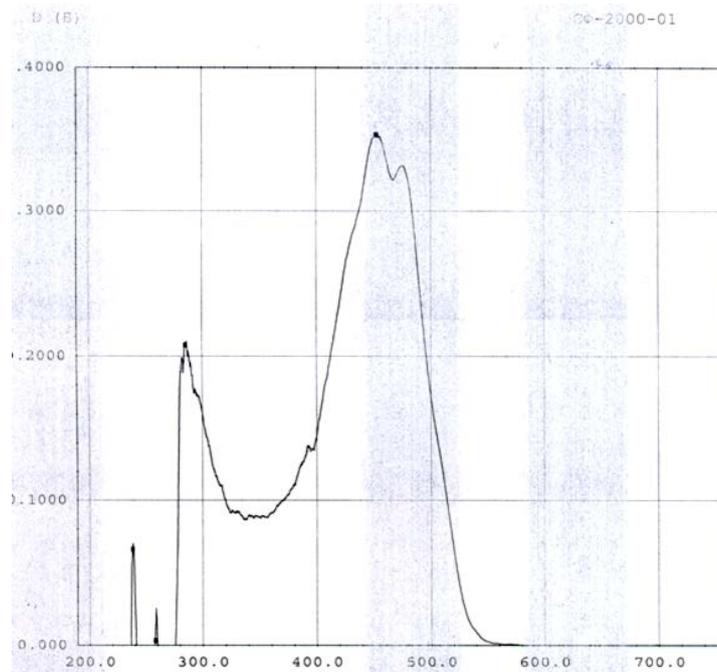


Рисунок 6.8 – Дифференциальный спектр поглощения раствора образца облепихового масла №2 в петролейном эфире

Дифференциальный спектр поглощения раствора образца облепихового масла №2 в аналитической области от 400 до 550 нм характеризуется двумя максимумами поглощения при 452, 476 нм и плечом в области 425-427 нм.

Результаты определения количественного содержания суммы каротиноидов в образце облепихового масла №2 представлены в таблице 6.8.

Таблица 6.8 Содержание суммы каротиноидов в образце облепихового масла №2

Опти- ческая плот- ность	Расчет по удельному показателю поглощения β-каротина – 2400		Расчет по удельному показателю поглощения β-каротина – 2592		Расчет с применением СО β-каротина	
	коли- чествен- ное содержа- ние, %	метрологи- ческие характерис- тики	коли- чествен- ное содержа- ние, %	метрологи- ческие характерис- тики	коли- чествен- ное содержа- ние, %	метрологи- ческие характерис- тики
0,353	0,146	$\bar{x} = 0,146$ $S\bar{x} = 0,001238$ $\Delta X = 0,003182$ $\varepsilon\% = 2,18\%$	0,135	$\bar{x} = 0,135$ $S\bar{x} = 0,001137$ $\Delta X = 0,002923$ $\varepsilon\% = 2,16\%$	0,121	$\bar{x} = 0,121$ $S\bar{x} = 0,001229$ $\Delta X = 0,003159$ $\varepsilon\% = 2,60\%$
0,352	0,145		0,134		0,120	
0,36	0,149		0,138		0,126	
0,364	0,150		0,139		0,123	
0,345	0,142		0,132		0,117	
0,350	0,144		0,133		0,121	

Анализ образца облепихового масла №2 методом дифференциальной спектрофотометрии показал, что суммарное содержание каротиноидов в образце, найденное по величине удельного показателя поглощения – 2400, составляет 0,146 % и около 0,136 % при расчете по величине удельного показателя поглощения – 2592. При определении суммы каротиноидов с применением СО β -каротина установлено среднее содержание каротиноидов в данном образце на уровне 0,121%. Таким образом, содержание суммы каротиноидов в образце №2 ниже нормы, декларируемой НД ЛП 002408-210314 [369] и Р №000245/02-260312 – не менее 0,180 % [368].

Установлено, что в спектре поглощения раствора образца облепихового масла №4 имеются два максимума поглощения при 452, 476 нм и плечо при 425-427 нм (Рисунок 6.9).

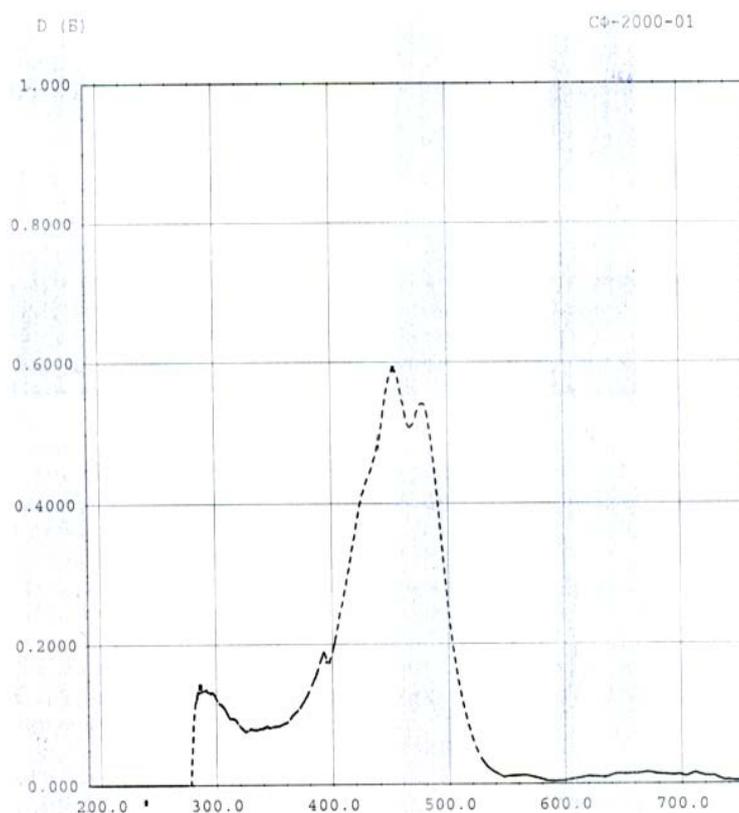


Рисунок 6.9 – Спектр поглощения раствора
образца облепихового масла №4

Результаты определения количественного содержания суммы каротиноидов в образце облепихового масла №4 представлены в таблице 6.9.

Таблица 6.9 Содержание суммы каротиноидов в образце облепихового масла №4

Опти- ческая плот- ность	Расчет по удельному показателю поглощения β-каротина – 2400		Расчет по удельному показателю поглощения β-каротина – 2592		Расчет с применением СО β-каротина	
	коли- чествен- ное содержа- ние, %	метрологи- ческие характерис- тики	коли- чествен- ное содержа- ние, %	метрологи- ческие характерис- тики	коли- чествен- ное содержа- ние, %	метрологи- ческие характерис- тики
0,591	0,246	$\bar{x} = 0,249$ $S\bar{x} = 0,001522$ $\Delta X = 0,003911$ $\varepsilon\% = 1,57\%$	0,228	$\bar{x} = 0,230$ $S\bar{x} = 0,00147$ $\Delta X = 0,003777$ $\varepsilon\% = 1,64\%$	0,202	$\bar{x} = 0,204$ $S\bar{x} = 0,001249$ $\Delta X = 0,00321$ $\varepsilon\% = 1,57\%$
0,587	0,245		0,226		0,201	
0,612	0,255		0,236		0,209	
0,598	0,249		0,231		0,205	
0,601	0,250		0,232		0,206	
0,590	0,246		0,228		0,202	

В промышленном образце облепихового масла производства ЗАО «Алтайвитамины» содержится в среднем 0,249 % каротиноидов в пересчете на β-каротин, если для расчетов использовать показатель удельного поглощения – 2400. При расчетах с величиной этого показателя – 2592 суммарное содержание каротиноидов составляет около 0,230 %. В обоих случаях содержание каротиноидов в образце №3 в 1,45 раза меньше, чем в образце №1. Если при количественном определении суммы каротиноидов в образце проводить с применением СО β-каротина, тогда этот показатель составляет 0,204 %, что также меньше, чем в экспериментальном образце облепихового масла №1.

Необходимо отметить, что при всех трех способах установления количественного содержания суммы каротиноидов промышленный образец №4 соответствует нормам НД – не менее 0,180 % [368].

Таким образом, экспериментальный образец облепихового масла №1, полученный на ЗАО «Вифитех», превосходит по содержанию каротиноидов промышленный образец облепихового масла №4. Эти результаты согласуются с данными, полученными при использовании в качестве растворителя н-гексана.

Анализ промышленного образца облепихового масла ЗАО «Вифитех» показал, что в спектре поглощения раствора образца облепихового масла №5 в петролейном эфире наблюдаются два максимума поглощения при 453, 478 нм и плечо при 424-428 нм (Рисунок 6.10).

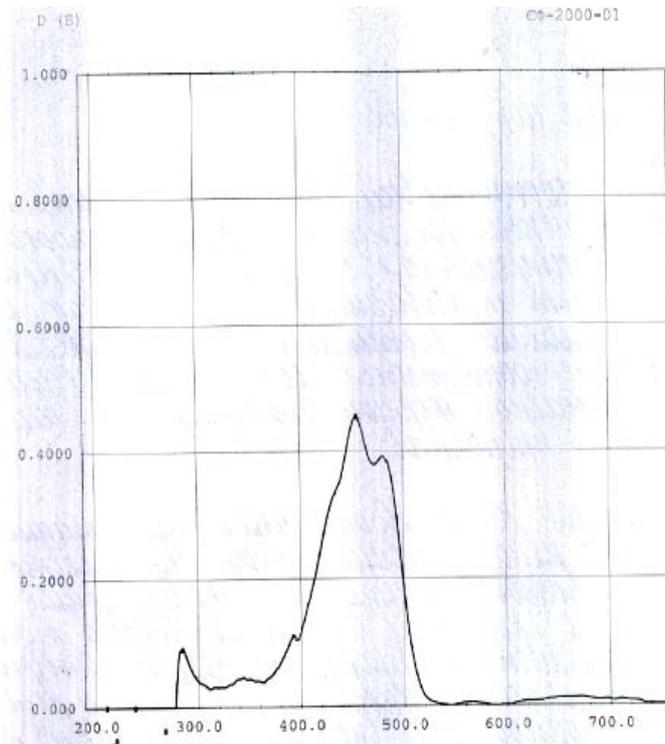


Рисунок 6.10 – Спектр поглощения раствора образца облепихового масла №5

Результаты определения содержания суммы каротиноидов в образце облепихового масла №5 представлены в таблице 6.10.

Таблица 6.10 Количественное содержание суммы каротиноидов в образце облепихового масла №5

Опти- ческая плот- ность	Расчет по удельному показателю поглощения β-каротина – 2400		Расчет по удельному показателю поглощения β-каротина – 2592		Расчет с применением СО β-каротина	
	коли- чествен- ное содержа- ние, %	метрологи- ческие характерис- тики	коли- чествен- ное содержа- ние, %	метрологи- ческие характерис- тики	коли- чествен- ное содержа- ние, %	метрологи- ческие характерис- тики
0,495	0,198	$\bar{x} = 0,195$ $S\bar{x} = 0,001108$ $\Delta X = 0,002847$ $\varepsilon\% = 1,46\%$	0,184	$\bar{x} = 0,181$ $S\bar{x} = 0,001088$ $\Delta X = 0,002795$ $\varepsilon\% = 1,55\%$	0,192	$\bar{x} = 0,189$ $S\bar{x} = 0,001108$ $\Delta X = 0,002847$ $\varepsilon\% = 1,51\%$
0,475	0,190		0,176		0,184	
0,485	0,194		0,180		0,188	
0,489	0,196		0,181		0,190	
0,490	0,196		0,182		0,190	
0,486	0,195		0,180		0,189	

На основании полученных результатов можно констатировать, что в образце облепихового масла ЗАО «Вифитех», полученного по традиционной технологии (образец №5), содержится в среднем около 0,195 % каротиноидов в

пересчете на β -каротин (удельный показатель поглощения – 2400), что в 1,8 раза меньше, чем в образце облепихового масла №1.

При использовании в расчетах значения удельного показателя поглощения – 2592 содержание каротиноидов составляет 0,181 %, что также значительно ниже, чем в экспериментальном образце №1 ЗАО «Вифитех». Суммарное содержание каротиноидов в анализируемом образце №5 соответствует требованиям НД ЛП 002408-210314 – не менее 0,180 % [369].

Установлено, что образец №1 превосходит промышленные образцы облепихового масла производства АО «Алтайвитамины» (образец №4) и ЗАО «Вифитех» (образец №5), что подтверждает данные, полученные при использовании н-гексана. Наблюдается корреляция результатов анализа всех образцов облепихового масла в растворах петролейного эфира и н-гексана.

Максимальное суммарное содержание каротиноидов установлено для экспериментального образца облепихового масла №1, полученного экстракцией метиленхлоридом плодов облепихи в условиях производства ЗАО «Вифитех». Содержание каротиноидов в промышленных образцах облепихового масла ЗАО «Алтайвитамины» (образце №4) и ЗАО «Вифитех» (образце №5) соответствует требованиям НД этих предприятий [368, 369] – не менее 0,180 % и составляет 0,249 % и 0,195 % соответственно.

Наименьшее суммарное содержание каротиноидов установлено для экспериментального образца облепихового масла, полученного экстракцией растительным маслом (образец №2) – 0,136 %.

При использовании в качестве растворителей и н-гексана, и петролейного эфира для образца №3 достоверно установить содержание каротиноидов методом спектрофотометрии не удалось.

С целью сравнительной оценки результатов исследования образцов облепихового масла они дополнительно были проанализированы методом ВЭЖХ. Результаты анализа образцов представлены в таблице 6.11.

Таблица 6.11 Количественное содержание суммы каротиноидов в образцах облепихового масла

Образец	Метод УФ спектрофотометрии, растворитель – н-гексан		
	Расчет по удельному показателю поглощения -каротина – 2592		Расчет с применением СО β-каротина
№1	0,287		0,270
№2	0,139		0,130
№3	—		—
№4	0,193		0,181
№5	0,192		0,180
Метод УФ спектрофотометрии, растворитель – петролейный эфир			
	Расчет по удельному показателю поглощения β-каротина – 2400	Расчет по удельному показателю поглощения β-каротина – 2592	Расчет с применением СО β-каротина
№1	0,363	0,334	0,230
№2	0,146	0,135	0,121
№3	—	—	—
№4	0,249	0,230	0,204
№5	0,195	0,181	0,189
Метод ВЭЖХ (суммарное содержание каротиноидов)			
№1	0,258		
№2	0,116		
№3	0,024		
№4	0,189		
№5	0,185		

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 β-каротина, а его значение значительно выше значений удельных показателей для других каротиноидов [55, 116, 130, 365], 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 β-каротина как доминантного каротиноида облепихового масла после апробации в условиях конкретных производств могут быть использованы в качестве фармакопейных в работе промышленных предприятия, производящих облепиховое масло.

6.3 Анализ образцов облепихового масла методом ТСХ

6.3.1 Условия проведения ТСХ-анализа образцов облепихового масла

На предварительном этапе испытания для каждого образца облепихового масла №1-5 было установлено, что оптимальным для ТСХ-анализа являются 0,0002 % растворы образцов облепихового масла в н-гексане и петролейном эфире (Глава 2). При просмотре хроматограмм в видимом свете установлено, что на треках всех анализируемых образцов облепихового масла идентифицируются зоны адсорбции на уровне зон адсорбции растворов СО β -каротина, ликопина и лютеина, относительный фактор удерживания β -каротина, ликопина, лютеина для всех образцов находился около 1. Важно отметить, что для растворов образцов масла в н-гексане и петролейном эфире были получены сходимые результаты, т.е. природа растворителя – н-гексан и петролейный эфир – не оказывала значимого влияния на полученные результаты.

Наиболее интенсивная окраска зон адсорбции на хроматограмме наблюдалась у образца облепихового масла № 1, менее интенсивная – №2, №4, №5, минимальная интенсивность у образца №3.

С учетом того, что слабо окрашенные пятна желтого цвета детектировать достаточно сложно, а под влиянием света интенсивность их окраски ослабевает, то в последующем сочетали визуальную детекцию пятен с обработкой хроматограмм 10 % раствором кислоты фосфорно-молибденовой (раствор проявителя) и последующим нагреванием до 60 °С в течение 2 мин [370]. После опрыскивания пластинки раствором проявителя зоны адсорбции всех каротиноидов окрашивались в ярко-синий цвет, общий фон – в зелено-желтый. С учетом предварительных испытаний [371] предложена методика ТСХ-анализа облепихового масла, которая была использована для сравнительного анализа образцов (Глава 2).

Идентификацию каротиноидов проводили по сравнению со СО β -каротина, лютеина, ликопина, остальные каротиноиды идентифицировали по величинам факторов удерживания, сравнивая их с опубликованными в периодической

литературе [95, 96, 132-135, 140-144] для использованных в эксперименте хроматографических условий.

6.3.2 Результаты ТСХ-анализа образцов облепихового масла в подвижной фазе I

В ходе эксперимента установлено, что образец облепихового масла №1 содержит 6 соединений производных каротина. В образце №2 обнаружено 5 соединений каротиноидной природы. Промышленные образцы облепихового масла №4 и №5 содержат четыре и один производные каротиноидов соответственно. Для каждой зоны адсорбции на всех хроматограммах были рассчитаны факторы удерживания, для β -каротина, ликопина и лютеина – относительные факторы удерживания. Результаты представлены в таблице 6.12.

Таблица 6.12 Значения факторов удерживания каротиноидов облепихового масла (подвижная фаза I)

Каротиноиды	Образцы, факторы удерживания				
	образец №1	образец №2	образец №3	образец №4	образец №5
Виолаксантин	0,11	-----	-----	-----	-----
Зеаксантин	0,31	0,30	-----	-----	-----
Лютеин	0,37	0,36	-----	0,30	-----
β -Криптоскантин	0,61	0,60	-----	-----	-----
γ -Каротин	-----	-----	-----	0,68	-----
Ликопин	0,80	0,83	-----	0,80	-----
β -Каротин	0,97	0,96	0,91	0,93	0,93

Как показали результаты исследования, образец облепихового масла №1 максимально насыщен каротиноидами.

При этом в соответствии с данными литературы и собственными исследованиями (Глава 2) те каротиноиды, для которых не были использованы СО, идентифицированы как виолаксантин, зеаксантин, β -криптаксантин [95, 96, 132-135, 140-144].

В образце облепихового масла №2 было подтверждено наличие пяти каротиноидов, которые были идентифицированы как β -каротин лютеин, ликопин, зеаксантин, β -криптоксантин. Виолаксантин в этом образце идентифицирован не был.

Трек образца масла №4 имел четыре зоны адсорбции, три из которых по хроматографической подвижности были идентичны СО лютеина, ликопина и β -каротина. Один каротиноид, был идентифицирован как γ -каротин на основании исследований раздела 6.1.

Для образцов облепихового масла №3 и №5 был детектирован и идентифицирован только один каротиноид – β -каротин.

Результаты анализа образцов облепихового масла № 1-5 в системе растворителей н-гексан-ацетон (6:2) позволяют сделать вывод о том, что более разнообразный состав каротиноидов имеет образец облепихового масла №1, максимально близкий к нему набор каротиноидов – пять соединений – имеет образец №2, причем эти соединения идентичны таковым в образце №1. ТСХ-анализ в этих хроматографических условиях не показал идентичности составов промышленных образцов облепихового масла №4 и №5. Образец масла облепихи №3 по результатам анализа содержит только β -каротин.

Во всех образцах идентифицирован доминантный каротиноид облепихового масла – β -каротин.

6.3.3 Результаты анализа образцов облепихового масла методом ТСХ в системе растворителей II

В ходе исследования в образце №1 было детектировано пять зон адсорбции, в образцах №2 – три, №4 – четыре, №5 – две зоны адсорбции. На хроматограмме образца №3 присутствовало одно пятно желто-оранжевого цвета (Таблица 6.13).

Таблица 6.13 Результаты анализа образцов облепихового масла в подвижной фазе II

Каротиноиды	Образцы, факторы удерживания				
	образец №1	образец №2	образец №3	образец №4	образец №5
Виолаксантин	0,18	-----	-----	-----	-----
Зеаксантин	0,41	-----	-----	0,41	-----
Лютеин	0,48	0,47	-----	0,49	-----
γ -Каротин	-----	0,63	-----	-----	0,63
Ликопин	0,67	-----	-----	0,66	-----
β -Каротин	0,75	0,75	0,74	0,74	0,75

Согласно данным таблицы 6.13 можно констатировать, что наиболее широкий каротиноидный состав имеет образец № 1 – пять соединений. Из них в сравнении с зоной адсорбции СО идентифицированы β -каротин (желто-оранжевая зона с R_f около 0,75), ликопин (оранжево-красная зона с R_f около 0,67), лютеин (розово-желтая зона адсорбции, R_f – около 0,48). По розово-желтой окраске зоны адсорбции и ее положению на хроматограмме идентифицированы виолаксантин и зеаксантин (желтая зона адсорбции, R_f – около 0,41) [55, 116, 130, 131]. Последовательность расположения зон адсорбции виолаксантина, зеаксантина и лютеина дополнительно подтверждается данными литературы. В частности, согласно данным Г. Бриттона [55] зеаксантин, представляющий собой β, β -каротин-3,3'-диол, имеет большее сродство к неподвижной фазе и прочнее удерживается на ней, чем лютеин (β, ϵ -каротин-3,3'-диол). Кроме того, зеаксантин является менее полярным соединением, чем виолаксантин и имеет большее сродство в подвижной фазе, следовательно, его зона адсорбции (около 0,41) ожидаемо находится выше зоны адсорбции виолаксантина (около 0,2).

Дополнительно в образце было установлено присутствие еще одной зоны адсорбции, которая была изначально окрашена в желтый цвет, а после ее обработки проявителем окрасилась в синий цвет. Кроме того, хроматографическая подвижность этого соединения позволяет предположить, что это – производное каротина, т.к. зона около 0,2 соответствует производным три- и тетрагидрокаротиноидам [55, 116, 130, 131]. Это соединение нами

идентифицировано как γ -каротин на основании данных, полученных в разделе 6.1 настоящей главы.

Образцы №2 и №4 по каротиноидному составу близки к образцу облепихового масла №1. На треке образца №4, кроме зон адсорбции, соответствующих β -каротину, лютеину и ликопину, дополнительно идентифицирован зеаксантин.

Каротиноидный состав образца облепихового масла №5 представлен двумя соединениями: β -каротином и ликопином. На хроматограмме образца №3 был детектирован только β -каротин.

Таким образом, результаты хроматографирования образцов облепихового масла № 1-5 в системе растворителей петролейный эфир-диэтиловый эфир-кислота уксусная (85:15:1) показали, что наиболее широкий каротиноидный состав у образца масла №1, близкий к нему состав каротиноидов имеют образцы №2 и №4.

6.3.4 Результаты анализа образцов облепихового масла методом ТСХ в системе растворителей III

В ходе исследования для образцов №1 и №2 было зафиксировано пять зон адсорбции, для образца №3 – три, для образца №4 – две и №5 – одна зона адсорбции (Таблица 6.14).

Анализ образцов облепихового масла в системе растворителей диэтиловый эфир-петролейный эфир (3:1) показывает, что наибольшее количество каротиноидов в образце масла №2 – пять соединений. В этом образце были идентифицированы лютеин, ликопин и β -каротин в сравнении со СО этих соединений, а также по данным раздела 6.1 виолаксантин и β -криптоскантин.

Таблица 6.14 Факторы удерживания каротиноидов в подвижной фазе III

Каротиноиды	Образцы, факторы удерживания				
	образец №1	образец №2	образец №3	образец №4	образец №5
Неоксантин	0,09	-----	-----	-----	-----
Виолаксантин	-----	0,12	-----	0,13	-----
β -Криптоскантин	0,19	0,20	-----	-----	-----
Зеаксантин	0,40	-----	-----	-----	-----
Лютеин	0,62	0,63	-----	-----	-----
Ликопин	-----	0,66	-----	-----	-----
β -Каротин	0,76	0,76	0,76	0,75	0,76

Пять каротиноидов обнаружены в образце №1, из которых идентифицированы три соединения – β -каротин, лютеин и β -криптоскантин. Кроме того, в этом образце, в отличие от образца №2, идентифицирован зеаксантин. Каротиноид с фактором удерживания 0,09 был определен как неоксантин. Образец №4 содержит β -каротин и виолаксантин с фактором удерживания около 0,13.

Использованные хроматографические условия позволили зафиксировать наличие в экспериментальном образце облепихового масла №3 β -каротин, лютеин, ликопин.

Анализ показал наличие только β -каротина в промышленном образце №5.

Результаты анализа доказывают, что все образцы содержат доминантный каротиноид плодов облепихи – β -каротин.

6.3.5 Результаты анализа образцов облепихового масла методом ТСХ в системе растворителей IV

После хроматографирования в системе растворителей петролейный эфир-бензол (10:1) на хроматограммах всех образцов облепихового масла проявляются от трех до семи зон адсорбции, принадлежащих каротиноидам (таблица 6.15).

Таблица 6.15 Факторы удерживания каротиноидов для подвижной фазы IV

Каротиноиды	Образцы, факторы удерживания				
	образец №1	образец №2	образец №3	образец №4	образец №5
β -Каротин	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Ликопин	0,06	-----	-----	0,06	0,06
β -Криптоксантин	0,06	0,06	-----	-----	-----
γ -Каротин	0,15	-----	-----	0,15	0,15
Неоксантин	0,18	-----	-----	-----	0,19
Виолаксантин	-----	0,19	-----	0,19	-----
Лютеин	0,30	0,30	-----	-----	-----
Зеаксантин	0,35	0,34	-----	0,34	0,34

Установлено, что образец №1 содержит β -каротин (ярко-оранжевая окраска пятна), ликопин (красно-розовая окраска пятна), лютеин (ярко-желтая окраска пятна), β -криптоксантин (зелено-желтая окраска пятна), γ -каротин (розово-желтая окраска пятна) и зеаксантин (оранжевая окраска пятна), неоксантин (желтая окраска пятна).

Для образца №2 доказано присутствие β -каротина (ярко-оранжевая зона), β -криптоксантина (зелено-желтая зона), виолаксантина (розово-желтая зона), лютеина (ярко-желтая зона) и зеаксантина (оранжевая зона).

В экспериментальном образце №3 идентифицирован β -каротин.

Промышленные образцы №4 и №5 имеют близкий состав. Оба образца содержат β -каротин, ликопин, γ -каротин и зеаксантин. В образце №4, помимо этого, содержится виолаксантин, который не обнаружен в образце №5, при этом образец облепихового масла №5 содержит неоксантин.

Таким образом, проведя анализ образцов облепихового масла, полученных отличающимися технологиями, можно констатировать, что наиболее богатый состав каротиноидов имеет опытный образец №1, полученный по экспериментальной технологии, основанной на экстракции каротиноидов метиленхлоридом их плодов облепихи. Учитывая, что биологически активными

соединениями облепихового масла являются каротиноиды, то эта технология имеет преимущества перед уже используемыми с позиций численного набора каротиноидов.

Специфичность ТСХ-анализа повышается при условии использования СО каротиноидов. Во всех образцах с использованием всех четырех ПФ был идентифицирован доминантный каротиноид облепихового масла – β -каротин, поэтому возможно рекомендовать производителям внести изменения в НД, регламентирующие 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 6

Проведенный сравнительный «слепой» анализ пяти экспериментальных и промышленных образцов облепихового масла методами спектрофотометрии, ТСХ и ВЭЖХ позволил подтвердить обоснованность обновления технологии получения облепихового масла в условиях ЗАО «Вифитех» и выбрать образец с максимально широким набором каротиноидов как компонентов, обеспечивающих фармакологическую активность этого ЛС.

Анализ образцов облепихового масла как лекарственного средства с каротиноидами, уже зарегистрированного в РФ, показал, что рекомендованные нами методы анализа субстанций этой группы БАВ применимы для анализа этой группы ЛС.

Безусловно, такой наукоемкий и современный метод анализа, как масс-спектрометрия, может использоваться только на этапе научной разработки и оптимизации технологии получения ЛС, а также при выборе методов и разработке методик анализа. Приоритетными для производителей, особенно промышленных предприятий малой мощности, остаются методы спектрофотометрии и ТСХ.

Следует отметить, что использование н-гексана и петролейного эфира как оптимальных растворителей для анализа именно масел позволяет получать сходимые результаты.

Максимально достоверным и доказательным является расчет суммарного количественного содержания каротиноидов с применением СО β -каротина как доминантного каротиноида облепихового масла.

На примере исследования пяти образцов облепихового масла показано, что необходимо внедрять метод ВЭЖХ как фармакопейный для анализа ЛС, содержащих в качестве действующих компонентов каротиноиды.

Очевидно, что такая тенденция приведет к удорожанию анализа, а впоследствии и самого лекарственного средства, но этот шаг может быть оправдан, т.к. позволит производителю контролировать ЛС не только на соответствие требованиям НД, но с позиций его возможного фальсификата,

поскольку эксклюзивность технологии, в частности подходов к экстрагентам и исходному сырью, позволит производителю получать облепиховое масло с уникальным набором каротиноидов.

Данные, полученные после проведения эксперимента в рамках главы 6, являются определяющими при построении обобщенной методологии конструирования ЛФ на основе каротиноидов, т.к. связывают исследовательский эксперимент с производством и являются выходом блока А4 и входом блока А5 дизайна исследования в нотации IDEF0 (Рисунок 2.4, Глава 2).

ГЛАВА 7 СОВМЕЩЕННАЯ МЕТОДОЛОГИЯ ИЗУЧЕНИЯ КАРОТИНОИДОВ И СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ИХ ОСНОВЕ В НОТАЦИИ IDEF0

Согласно современным представлениям понятие «методология» трактуется, прежде всего, как учение о структуре, методах, средствах и логической организации какой-либо деятельности [371, 372, 373].

Для полноценной характеристики структуры работ, направленных на изучение каротиноидов как объектов фармацевтической деятельности, а также логической организации этого процесса, в частности использования методов, средств, приемов и подходов, необходимо создание стройной системы, которую другие исследователи могли бы использовать на разных этапах своей деятельности.

Проведенный IDEF0-дизайн экспериментальной части работы (Рисунок 2.2, Глава 2) и согласованность полученных данных подтверждают, что нотация IDEF0 может успешно использоваться для функционального моделирования исследовательской деятельности в области фармации.

Систематизация накопленного теоретического и экспериментального материала в области изучения каротиноидов и создания ЛФ на их основе проведена нами путем построения модели в нотации IDEF0.

Цель построения модели IDEF0 – 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 своей деятельности.

Изучение любого класса БАВ в конечном 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 7.1). Контекстная диаграмма, которая всегда имеет номер «А0», отражает генеральное направление (процесс или идею), которому подчинено все исследование. Такая формулировка контекстной диаграммы представляется нами оправданной, т.к. объединяет весь спектр исследований, которые необходимы для реализации поставленной цели.

Одним из условий успешного построения диаграмм IDEF0 является детализация любой из дочерних диаграмм, причем уровень детализации исследователь может выбирать самостоятельно [233].

Фундаментальным правилом для диаграмм IDEF0 является наличие не менее трех и не более шести блоков в пределах одной диаграммы. Каждому блоку присваивается номер, а каждый блок родительской диаграммы может быть детализирован нужным числом дочерних диаграмм. Такое жесткое подчинение создает иерархию модели и позволяет в дальнейшем оценить ее качество [231-234].

Как и любой научно-исследовательский процесс, изучение каротиноидов регулируется в рамках правового поля. Это отражается в соблюдении исследователем требований нормативно правовых документов [117, 375, 376], поэтому эти документы выделены нами в качестве управляющих на контекстной диаграмме и диаграмме детализации первого уровня (Рисунок 7.1).

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: цех, научную лабораторию, оборудование, приборы, материалы, реактивы и др., – обеспечивающий приведение квалифицированного эксперимента. Этот процесс отражен нами в контекстной диаграмме в виде механизмов (Рисунок 7.1).

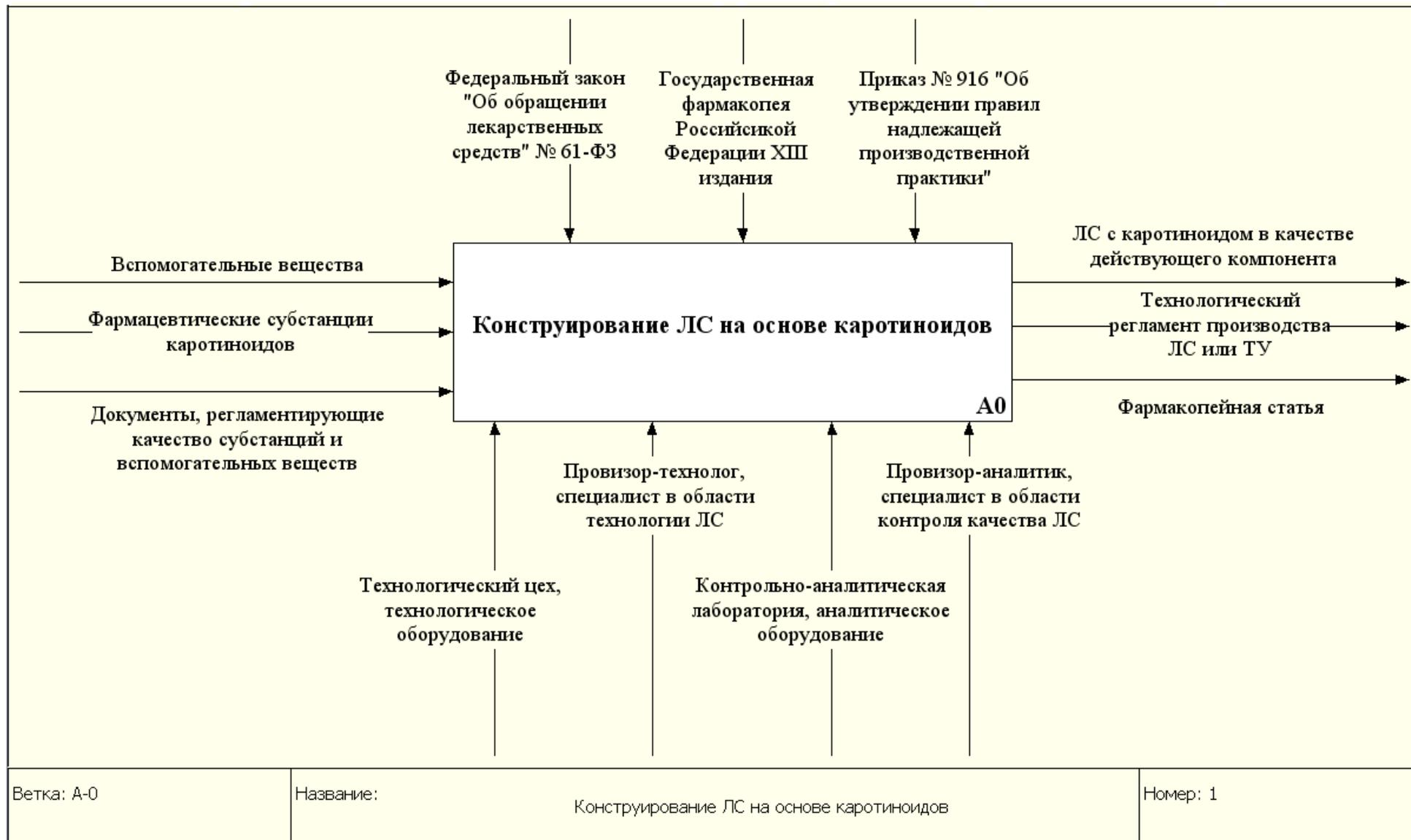


Рисунок 7.1 – Контекстная диаграмма процесса изучения каротиноидов и создания ЛС на их основе

Входом для диаграммы первого уровня являются те материалы, которые исследователь получает в ходе подготовительного или предварительного, как правило, теоретического этапа исследования. В частности, это могут быть результаты информационно-патентного поиска, предварительные собственные исследования, данные об исходном сырье и растворителях.

На контекстной диаграмме (Рисунок 7.1) 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 или его этапов.

В соответствии с принципами построения IDEF0 модели была произведена детализация контекстной диаграммы. Дочерняя диаграмма первого уровня состоит из пяти смысловых блоков-подфункций (Рисунок 7.2).

Представленные пять блоков-подфункций объединяют весь комплекс взаимосвязанных теоретических и экспериментальных работ, которые необходимо провести для решения задачи по созданию ЛС, содержащего в качестве активного компонента индивидуальный каротиноид, а именно: получить субстанцию каротиноида (А1); проанализировать субстанцию каротиноида (А2); стабилизировать субстанцию каротиноида (А3); провести стандартизацию субстанции и получить ЛФ (А4); осуществить анализ и стандартизацию полученной ЛФ (А5). Принципиально такой структурированный подход может быть основной общего дизайна любого исследования, связанного с изучением каротиноидов как класса БАВ.

Как демонстрируется на диаграмме 7.2, входы, управления, выходы и механизмы блоков-подфункций взаимосвязаны. Например, выходы блока А1 – «Субстанция каротиноида» и «Способ получения каротиноида» являются управлением и входом для блоков-подфункций А2, А3, А4 и А5; выходы блока А2 – «Методы и методики анализа каротиноидов», «Показатели качества» – входы для блоков А3, А4 и управление для блока А3; выходы А3 – «Пути



Рисунок 7.2 – Диаграмма первого уровня детализации

стабилизации каротиноида» и «Стабильная субстанция каротиноида» – входы для А4. Выходы А4 выступают в качестве входов для блока А5. Эта взаимосвязь подфункций позволяет гармонизировать этапы исследования и делает их логически связанными.

Очевидно, что каждый из подуровней от А1 до А5, представленных на рисунке 7.2, требует дальнейшего уточнения. Диаграмма 7.2 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 [231-234].

Теоретической и экспериментальной базой для детализации подфункции А1 общей модели явились данные главы 3 настоящего исследования. Второй уровень детализации изучаемого процесса представлен на рисунке 7.3.

Как того требует стандарт IDEF0 [233], диаграмме всегда присваивается номер того узла, который она конкретизирует [231-234]. Диаграмма 7.3 является дочерней для блока А1 диаграммы 7.2 и содержит 5 блоков, которые имеют номера от А11 до А15.

Структура диаграммы 7.3, в частности входы, показывают ее взаимосвязь с диаграммами более высокого уровня (Рисунки 7.1, 7.2), при этом детализация подфункции А1 диаграммы 7.2 дает возможность конкретнее классифицировать исходную информацию и материальные средства на этапах «Подготовить исходное сырье для экстракции» (А12) и «Подготовить экстрагенты для экстракции (А11) (Рисунок 7.3).

Помимо этого, выход блока А15 «Способ получения каротиноида» диаграммы 7.4 регулирует работу подфункций А2, А3, А4 и А5. Выход «Субстанция каротиноида» является входами для блоков А2, А3 на диаграмме 7.2, что подтверждает вертикальную логическую связь диаграмм 7.1, 7.2, 7.3.



Рисунок 7.3 Дочерняя диаграмма блока A1 «Получить субстанцию каротиноида»

По нашему мнению, необходимо было провести детализацию функций блоков A12, A13. Диаграммы детализации третьего уровня представлены на рисунках 7.4 и 7.5.

Этот шаг необходим, т.к. подготовка исходного сырья (блок A12) является критической точкой в технологии получения каротиноидов. Адекватный выбор исходного сырья и правильная его подготовка для экстракции напрямую влияют на эффективность экстракции, что подтверждено экспериментальными данными разделов 3.1, 3.2 настоящего исследования.

В свою очередь, без уточнений по этапу экстракции каротиноидов (A13) не возможна успешная систематизация материала разделов 3.4 – 3.6, приведенных выше. Теоретические данные и результаты эксперимента, изложенные в главе 3, были структурированы в виде блока детализации A12 (Рисунок 7.4).

Входы для блока A121 (Рисунок 7.4), и A1 (Рисунок 7.2), и A12 (Рисунок 7.5) представляют собой одинаковый набор теоретических данных и, возможно, собственных пилотных исследований. Блоки A122, A123, A124, A125, A126 – это пошаговая детализация стадии вспомогательных работ «Подготовка исходного сырья и экстрагента» технологической схемы получения субстанций каротиноидов (Рисунок 3.7, Глава 3). При этом любой исследователь, используя диаграмму 7.4, имеет конкретное руководство по этапу подготовки сырья и экстрагента.

Диаграмма 7.5 является связующим звеном между блоками A11, A12 и A14 (Рисунок 7.2) – это первая часть основного технологического цикла схемы получения субстанций каротиноидов, отраженного в унифицированном способе получения каротиноидов (Рисунок 3.7, Глава 3).

Структурирование этапа «Провести экстракцию суммы каротиноидов» – блок A13 позволяет раскрыть функционирование унифицированной методики получения каротиноидов. Исследователь, акцентируя внимание на управляющих для каждого блока, может использовать разработанный нами унифицированный способ (Глава 3) для получения необходимого каротиноида (Рисунок 7.5).

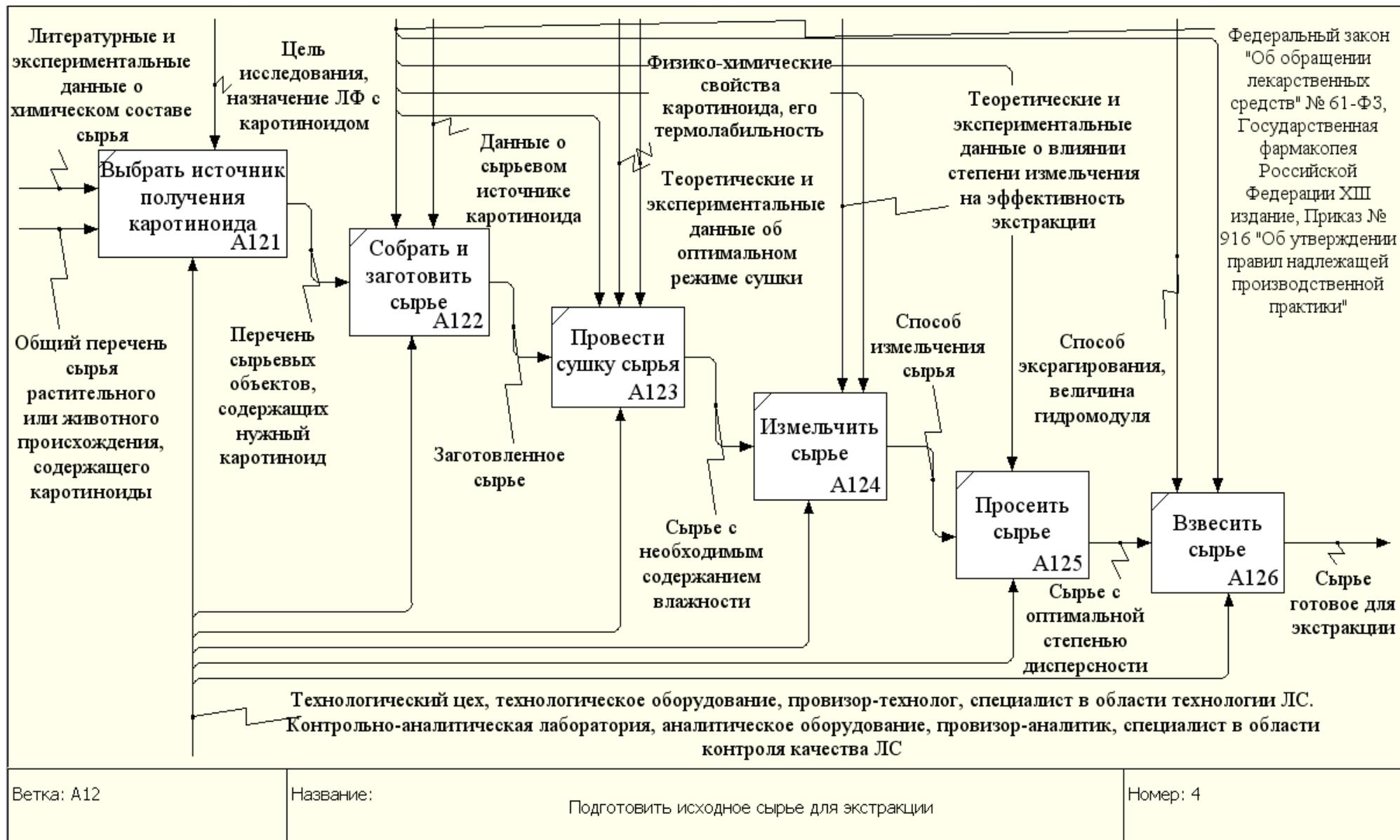


Рисунок 7.4 – Детализация третьего уровня блока А12 «Подготовить исходное сырье для экстракции»



Рисунок 7.5 – Детализация третьего уровня блока А13 «Провести экстракцию суммы каротиноидов»

Управления на диаграмме третьего уровня 7.5, в частности, «Кратность экстракции, время контакта фаз», «Концентрация омыляющего агента и время экспозиции», были оптимизированы методом математического планирования эксперимента (Глава 3) и поэтому могут быть применены в любом эксперименте.

При реализации действий в соответствии со схемой рисунка 7.5 продуктом этого этапа исследования всегда будут «Субстанция каротиноида» и «Способ получения каротиноида». В нашем случае результат по этим подфункциям, т.е. выход, реализован и закреплён в виде патента РФ №2648452 «Способ получения каротиноидов». Каждый экспериментатор, суммируя и анализируя информацию о модели, в случае необходимости может скорректировать методику в зависимости от выбранного источника каротиноида.

При получении индивидуальных каротиноидов особое значение имеет подтверждение индивидуальности полученного соединения. На этом этапе исследования незаменимыми являются методы, позволяющие установить или подтвердить структуру полученного каротиноида, поэтому была проведена детализация подфункции А2 «Проанализировать субстанцию каротиноида» диаграммы первого уровня (Рисунок 7.2). Экспериментальной и теоретической основой для этого этапа моделирования стали результаты, представленные в главе 4 настоящего исследования. Результат обобщения экспериментального материала главы 4 и расширения подфункции А2 – это диаграмма 7.6 (Рисунок 7.6).

Процесс анализа каротиноидов объединяет несколько направлений. Первое – это подтверждение получения конкретного каротиноида(ов), которое базируется на установлении/подтверждении его (их) структуры с помощью передовых аналитических методов. Второе заключается в установлении степени чистоты полученного(ных) 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 7.6). Каждое из этих направлений может

быть реализовано как самостоятельное исследование в рамках общего научного направления.

Диаграмма 7.6 демонстрирует взаимосвязь методов анализа, которые применимы к анализу каротиноидов. Приоритетными и специфичными методами установления или подтверждения структуры полученного каротиноида являются ЯМР, ИК-спектроскопия и масс-спектрометрия, что экспериментально подтверждено результатами главы 4 настоящего исследования.

Метод УФ-спектрофотометрии не теряет своей актуальности, тем более что повысить его специфичность можно, используя для анализа СО каротиноидов, несколько разнополярных растворителей. Кроме того, применив расчет отношения интенсивности третьего максимума поглощения ко второму в процентах (Ш/П, %), исследователь может предварительно установить степень чистоты полученного каротиноида, что позволяет избежать применения крайне дорогостоящих стандартов на ранних этапах исследования.

Логическая связь диаграмм нижнего и верхнего уровней прослеживается во взаимном влиянии входов, управлений и выходов.

Например, общими управлениями диаграммы первого уровня детализации 7.2 и диаграммы 7.6 является способ получения каротиноида. Вход детализации блока А2 «Субстанция каротиноида предполагаемого строения» является выходом блока А1 контекстной диаграммы, т.е. диаграмма 7.6 логически вписывается в общую структуру контекста (Рисунок 7.2).

Выходы диаграммы детализации А2 – «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 7.6 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.



Рисунок 7.6 – Детализация второго уровня блока A2 «Проанализировать субстанцию каротиноида»

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, что подтверждается общностью выходов для диаграммы 7.6 и входов для блока А3 на диаграмме 7.2.

В связи с тем что получение стабильной субстанции каротиноидов является многогранной технологической задачей, которая нами была решена посредством микрокапсулирования этих соединений, а пошагово описать этот процесс в пределах одной контекстной диаграммы не представлялось возможным, было проведено структурирование этого блока. Экспериментальной базой для детализации второго уровня подфункции А3 «Стабилизировать субстанцию каротиноида» были материалы главы 5 настоящего исследования. Второй уровень детализации блока А3 представлен на рисунке 7.7.

Взаимосвязь подфункции А3 «Стабилизировать субстанцию каротиноида» с другими блоками контекстной диаграммы 7.2 прослеживается в общности их входов и выходов и реализуется детализацией второго уровня – диаграмма 7.7. Например, выходы блока А2 «Проанализировать субстанцию каротиноида» – «Показатели качества субстанции» и «Методы и методики анализа каротиноидов» являются входами для детализированной диаграммы 7.7, в частности блока А31 и подфункции А3.

Управлением для всех блоков диаграммы 7.7 является интерфейс «Показатели качества субстанции». Аналогично регулируется работа этого уровня модели данными о «Свойствах каротиноидов».

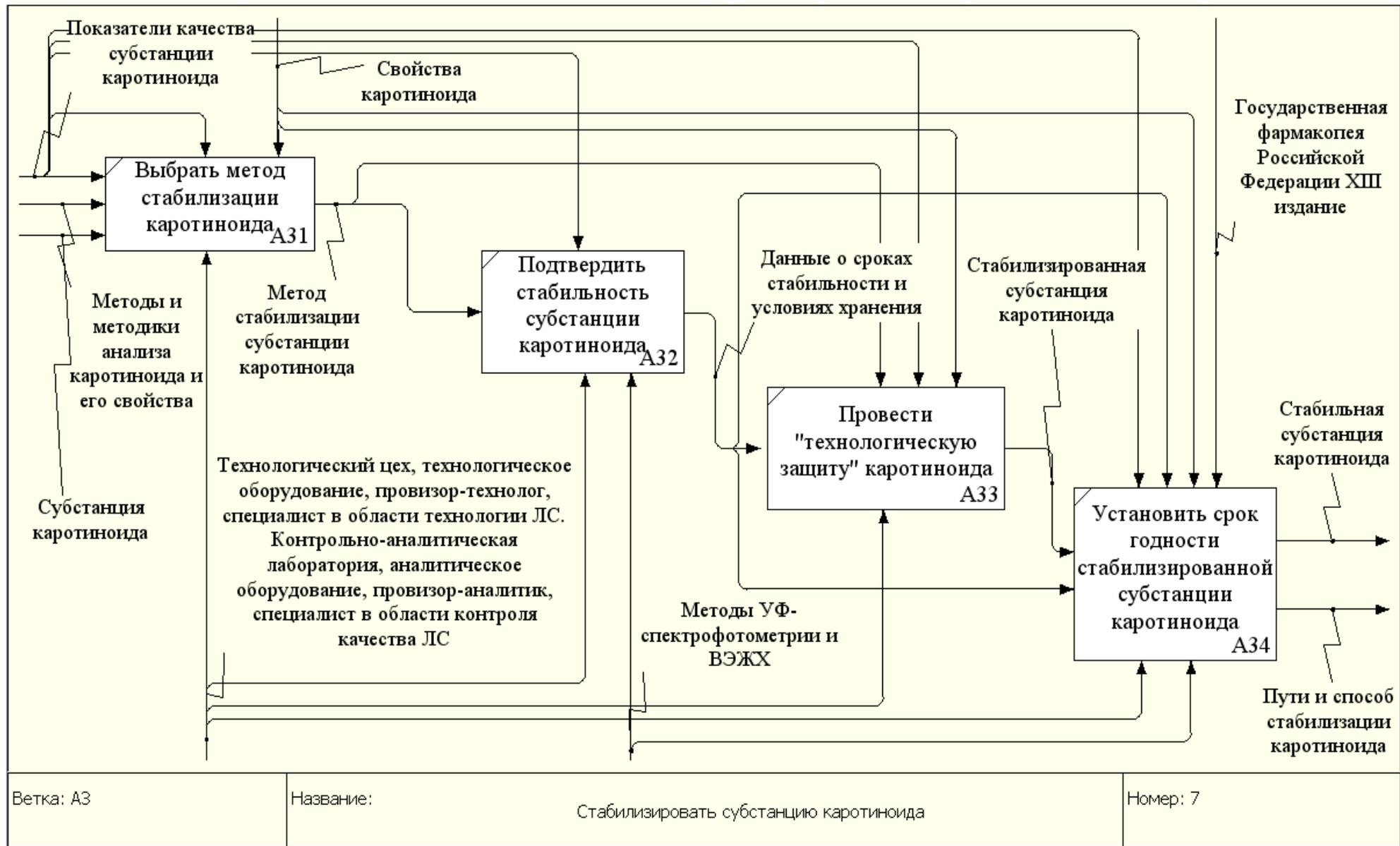


Рисунок 7.7 – Детализация второго уровня блока АЗ «Стабилизировать субстанцию каротиноида»

Первый блок диаграммы 7.7 – А31 «Выбрать метод стабилизации каротиноида» может быть реализован посредством любого технологического приема, однако он должен обязательно учитывать «Свойства изучаемого каротиноида», в частности, его термолабильность и светочувствительность, поэтому этот принцип отражен в интерфейсе. В главе 5 микрокапсулирование экспериментально было обосновано как метод стабилизации каротиноидов и выбран оптимальный способ получения микрокапсулированных субстанций каротиноидов. Исследователь может выбрать и другой путь, но для получения оптимального результата необходимо учитывать индивидуальные свойства каротиноидов, показатели их качества, т.е. руководствоваться управляющими интерфейсами.

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 7.7.

Наличие стабилизированной субстанции дает возможность получения ЛФ на ее основе и придает исследованию заверченный вид. Только гармоничное взаимодействие технологии и анализа позволяет эффективно решать задачи конструирования ЛФ. Технологический аспект этого направления отражен на диаграмме 7.8, аналитическое сопровождение зафиксировано на диаграмме 7.9.

Блок А33 второго уровня детализации А3 «Стабилизировать субстанцию каротиноида» – «Провести “технологическую защиту” каротиноида» может быть реализован как одна из стадий получения ЛФ. Например, при условии, что способом стабилизации каротиноида является микрокапсулирование, то ЛФ могут быть, например, капсулы (Глава 5). В этом разделе модели важен единый подход к стабилизации и дальнейшему конструированию ЛФ на базе этой уже стабилизированной субстанции (блок А4 диаграммы 7.2), т.е. способ стабилизации должен обеспечивать технологическую возможность дальнейшего получения и анализа ЛФ. Эта взаимосвязь продемонстрирована диаграммами 7.8 и 7.9.

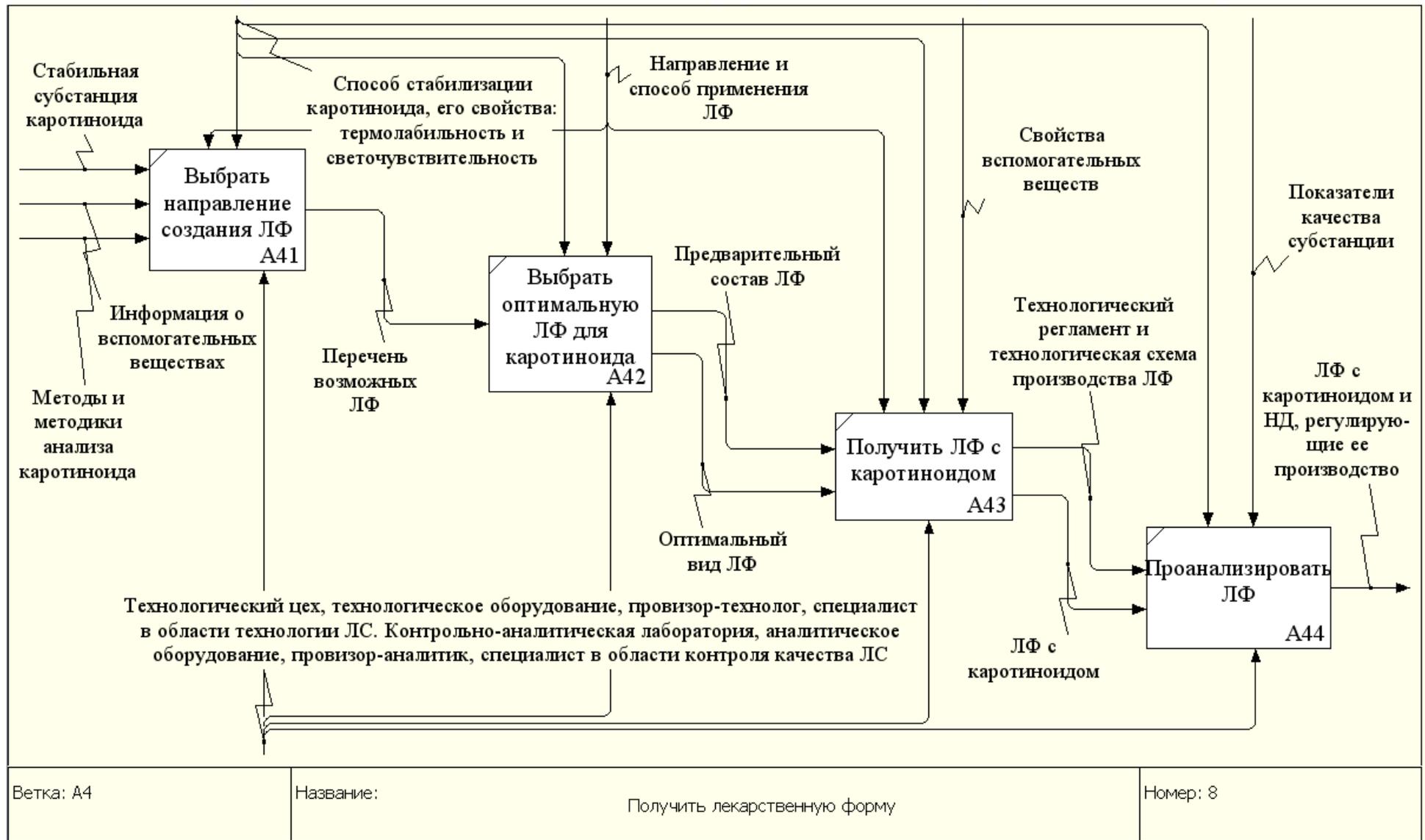


Рисунок 7.8 – Детализация второго уровня блока А4 «Получить лекарственную форму»



Рисунок 7.9 – Детализация второго уровня блока А5 «Осуществить анализ и стандартизацию лекарственной формы»

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 7.8 и 7.9. 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 7.8). Второй аспект, которым обязательно должен руководствоваться исследователь, – аналитические возможности, т.е. методы анализа будущей ЛФ, которые базируются на результатах анализа субстанции каротиноида. Это подтверждается принципом сквозной стандартизации от субстанции к ЛФ. Это положение отражено в блоках детализации подфункции А5 диаграммы 7.9: 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 7.9.

Учитывая разнонаправленность фармакологической активности каротиноидов, исследователь при выборе ЛФ должен принимать во внимание «Направление и способ применения ЛФ» (Рисунок 7.8). Например, ЛФ с β -каротином могут применяться и наружно и внутрь [260], лютеин входит, как правило, во внутренние ЛС. Ликопин чаще используют в виде капсул и таблеток [261], хотя имеются сведения о его трансдермальной активности [55, 265]. Для астаксантина как «короля антиоксидантов среди каротиноидов» преимущественным является прием внутрь [31]. Очевидно, что если у исследователя имеются данные по специфическому виду активности исследуемого каротиноида, то эти данные являются управляющими интерфейсами в процессе создания и оптимизации ЛФ с каротиноидом (Рисунок 7.8).

Взаимосвязь получения ЛФ с каротиноидом (блок А43 диаграммы 7.8), ее анализа (блок А44 той же диаграммы) и стандартизации (блоки А52 – А54) прослеживается в общности интерфейсов. Так, общими управляющими для обеих

диаграмм 7.8 и 7.9 являются «Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» № 61-ФЗ, Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания», «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 7.1).

Таким образом, построенная в нотации IDEF0 модель может являться 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 как полностью, так и проводить частичное планирование и прогнозирование более узких этапов работы. Причем обоснованность входов, управлений, механизмов реализации функций и выходов позволят и полному, и фрагментарному исследованию быть научно-обоснованными и иметь практическую значимость.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 7

Впервые в фармацевтической отрасли графический язык в нотации IDEF0 применен для изучения и создания ЛС на основе природных или синтетических БАВ.

Впервые в фармацевтической отрасли на основе теоретических и собственных экспериментальных данных осуществлено моделирование совмещенной методологии изучения каротиноидов и создания ЛС на их основе с использованием технологии SADT в нотации IDEF0.

Предлагаемая методология разработана на модели технологии получения и стабилизации субстанций каротиноидов, процесса конструирования ЛФ с полученными субстанциями каротиноидов, их аналитического сопровождения и может быть применена на любом этапе изучения каротиноидов и разработки ЛФ на их основе.

Структура модели позволяет ей функционировать как в полном объеме, так и пошагово, т.е. отдельные ее разделы (уровни детализации) могут служить исходной матрицей более узконаправленных исследований, что проявится в дизайне любой другой научной работы.

Предложенная методология изучения каротиноидов, при учете взаимного влияния уровней детализации позволяет проводить прогнозирование результатов исследований в целом и фрагментарно, что обусловлено и подтверждено структурой самой модели.

Применение универсального и доступного графического языка в нотации IDEF0 позволит, по мере накопления экспериментальных данных в области изучения каротиноидов, в дальнейшем усовершенствовать, расширить построенную нами модель и объединить результаты всех исследований в этом направлении.

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: β -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 β -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 ЛИТЕРАТУРЫ:

1. ФГБУН Всероссийский институт научной и технической информации Российской академии наук : официальный сайт. – Москва. – URL: http://catalog.viniti.ru/srch_basic.aspx. (дата обращения: 18.11.2018).
2. Сергиенко, А.В. Фармакологическое обоснование использования лекарственных форм β -каротина для коррекции экспериментальной патологии: специальность 14.00.25 «Фармакология» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Сергиенко Аэлита Валерьевна ; Пятигорская государственная фармацевтическая академия. – Пятигорск, 2001 – 24 с. : ил.
3. Шелестова, В.В. Современные подходы к стандартизации лекарственных средств, содержащих каротиноиды: бета-каротин и ликопин: специальность 15.00.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Шелестова Валентина Васильевна ; Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений. – Москва, 2002. – 24 с. : ил.
4. Гаврилов, А.С. Методологические аспекты оптимизация биосинтеза субстанций и конструирование составов твердых лекарственных форм: специальность 15.00.01 «Технология лекарств и организация фармацевтического дела» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Гаврилов Андрей Станиславович ; Уральский НИИ технологии медпрепаратов. – Екатеринбург, 2004. – 40 с. : ил.
5. Северцева, О.В. Биофармацевтические и технологические аспекты создания лекарственных форм препаратов из каротинсодержащих растений и их стандартизация: специальность 15.00.02 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия»; 15.00.01 «Технология лекарств и организация фармацевтического дела» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Северцева Ольга Владимировна ; Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений. – Москва, 2005. – 48 с.: ил.

6. Первушкин, С.В. Комплексные исследования по разработке лекарственных средств на основе плодов расторопши пятилистной, травы чистотела большого и биомассы спируллины: специальность 15.00.01 «Технология лекарств и организация фармацевтического дела»; 15.00.02 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Первушкин Сергей Васильевич ; Самарский государственный медицинский университет. – Самара, 2000. – 48 с. : ил.
7. Поправка, О.В. Исследование состава масла шиповника и разработка новой лекарственной формы на его основе: специальность 15.00.01 «Технология лекарств и организация фармацевтического дела» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Поправка Ольга Владимировна ; Пятигорская государственная фармацевтическая академия. – Пятигорск, Санкт-Петербург межрегиональный центр «Адаптоген». – Санкт-Петербург, 2000. – 20 с. : ил.
8. Чахирова, А.А. Технологические исследования по разработке масляного экстракта из плодов рябины обыкновенной и перспективы его использования: специальность 15.00.01 «Технология лекарств и организация фармацевтического дела» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Чахирова Анна Анатольевна ; Пятигорская государственная фармацевтическая академия. – Пятигорск, 2008. – 23 с. : ил.
9. Малинина, И.В. Разработка сухого и масляного экстракта цветков бархатцев и перспективы их использования: специальность 15.00.01 «Технология лекарств и организация фармацевтического дела» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Малинина Инна Викторовна ; Пятигорская государственная фармацевтическая академия. – Пятигорск, 2011. – 24 с. : ил.
10. Информационный ресурс Государственной программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013-2020 : официальный сайт. – Москва. – URL: <http://pharma-2020.ru/index.php> (дата обращения: 03.03.2016.).

11. European Medicines Agency (EMA). – Амстердам. – URL: <http://www.ema.europa.eu> (дата обращения: 03.03.2016.).
12. Food and Drug Administration (FDA). – Вашингтон. – URL: <http://www.fda.gov> (дата обращения: 03.03.2016.).
13. Кабакова, Т.И. Результаты социологического опроса потребителей седативных препаратов безрецептурного отпуска / Т.И. Кабакова, Н.А.Андреева, Е.А. Попова. // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 11-1. – С. 202-207. – URL: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=28976> (дата обращения: 18.11.2018).
14. Щербакова, Е.М. Заболеваемость населения России, 2015-2016 годы / Е.М. Щербакова. // *Демоскоп Weekly*. – 2017. – С. 721-722. – URL: <http://demoscope.ru/weekly/2017/0721/barom01.php> (дата обращения: 18.11.2018).
15. Попов, А.М. Перспективы клинического применения астаксантина и других оксигенированных каротиноидов / А.М. Попов, О.Н. Кривошапко, О.Н. Артюков. // *Биофармацевтический журнал* – 2013. – Т.5, №5. – С. 13 – 30.
16. Bovier, E. R. A randomized placebo-controlled study on the effects of lutein and zeaxanthin on visual processing speed in young healthy subjects / E. R. Bovier, B. R. Hammond. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.11.012> // *Archives of biochemistry and biophysics* – 2015. – Vol. 572. – P. 54-57. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986114004019?via%3Dihub>. – Дата публикации: 15 апреля 2015.
17. Lycopene and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis / P. Chen, Ping, Zhang, Wenhao, Wang, Xiao [et al.]. – DOI: 10.1097/MD.0000000000001260// *Medicine (Baltimore)*. – 2015. – № 94. – P. 1260. – URL: <https://journals.lww.com/md-journal/Pages/articleviewer.aspx?year=2015&issue=08030&article=00009&type=Fulltext#pdf-link> (дата обращения: 18.11.2018).
18. Hepatoprotective and antioxidant effects of lycopene in acute cholestasis / M. Tokac, S. Aydin, G. Taner [et al.]. – DOI:10.3906/sag-1404-57. // *Turkish Journal of Medical Sciences*. – 2015. – № 45. – P. 857 –864. – URL: <https://dergipark.org.tr/download/article-file/130311>. – Дата публикации: 30 июля 2015.

19. Takuji, Tanaka Cancer chemoprevention by carotenoids. Review / Takuji Tanaka, Masahito Shnimizu, Hisataka Moriwaki. – DOI.org/10.3390/molecules17033202. // Molecules. – 2012. – №17. – P. 3202 – 3242. – URL: <https://www.mdpi.com/1420-3049/17/3/3202>. – Дата публикации: 14 марта 2012.
20. Dynamic action of carotenoids in cardioprotection and maintenance of cardiac Health. Review / Mahesh Agarwal, Royapuram P. Parameswari, Hannah R. Vasanthi, Dipak K. Das. – DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules17044755>. // J. Mol. Sci.. – 2012. – № 17(4). – P. 4755–4769. – URL: <https://www.mdpi.com/1420-3049/17/4/4755/htm>. – Дата публикации: 23 апреля 2012.
21. Vitaminand carotenoid intake and risk of head-neck cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study / Leonie de Munter, Denise He Maasland, Piet A van den Brandt [et al.]. – DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.106096>. // American Journal of Clinical Nutrition. – 2015. – № 102. – P. 420 – 432. – URL: <https://academic.oup.com/ajcn/article/102/2/420/4564549>. – Дата публикации: 8 июля 2015.
22. Lycopene attenuates inflammation and apoptosis in post-myocardial infarction remodeling by inhibiting the nuclear factor-kappa B signaling pathway / Q. He, W. Zhou, C. Xiong [et al.]. – DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2676>. // Molecular medicine reports. – 2015. – № 11. – P. 374 – 378. – URL: <https://www.spandidos-publications.com/mmr/11/1/374>. – Дата публикации: 16 октября 2014.
23. Lycopene protects against acute zearalenoneinduced oxidative, endocrine, inflammatory and reproductive damages in male mice / S. P. Boeira, V. R. Funck, C. B. Filho [et al.]. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.02.003>. // Chemico-biological interactions. – 2015. – № 230. – P. 50-57. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279715000654>. – Дата публикации: 25 марта 2015.
24. Carotenoid consumption is related to lower lipid oxidation and DNA damage in middle-aged men / P. G. Cocate, A. J. Natali, R. C. G. Alfenas [et al.] . – DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114515001622>. // British Journal of Nutrition. – 2015. – № 114. – P. 257 – 264. – URL: <https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of>

- nutrition/article/carotenoid-consumption-is-related-to-lower-lipid-oxidation-and-dna-damage-in-middleaged-men/F0E7ED80535DE561BC376F50196D7A89. – Дата публикации: 28 июля 2015.
25. Characterization and antioxidant activity of beta-carotene loaded chitosan-graft-poly(lactide) nanomicelles / W. Ge, D. Li, M. Chen [et al.]. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.056>. // Carbohydrate Polymers. – 2015. – № 117. – P. 169–176. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861714009667?via%3Dihub>. – Дата публикации: 6 марта 2015.
26. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans / J. S. Park, J. H. Chyun, Y. K. Kim [et al.]. – DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-18>. // Nutrition & Metabolism. – 2010. – № 7(18). – P. 1 – 10. – URL: <https://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-7075-7-18>. – Дата публикации: 5 марта 2010.
27. Ultraviolet-B protection of ascorbate and tocopherol in plants related with their function on the stability on carotenoid and phenylpropanoid compounds / Y. Yao, J. You, Y. Ou [et al.]. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.02.021>. // Plant Physiology and Biochemistry. – 2015. – № 90. – P. 23-31. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942815000522>. – Дата публикации: 27 февраля 2015.
28. Beal, M. F. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration / M. F. Beal. – DOI: <https://doi.org/10.1002/ana.20624>. // Annals of Neurology. – 2005. – № 58(4). – P. 495 – 505. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ana.20624>. – Дата публикации: 21 сентября 2005.
29. Kim, S.H. Inhibitory effect of astaxanthin on oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction-a mini-review / S.H. Kim, H. Kim. – DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10091137>. // Nutrients. – 2018. – № 10(9). – P. 1137–1151. – URL: <https://www.mdpi.com/2072-6643/10/9/1137>. – Дата публикации: 21 августа 2018.

30. Mullineaux, C.W. Electron transport and light-harvesting switches in cyanobacteria / C.W. Mullineaux. – DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00007>. // *Frontiers in Plant Science*. – 2014. – № 5. – P. 7 – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00007/full>. – Дата публикации: 21 января 2014.
31. Капелли, Б. Природный астаксантин: король каротиноидов / Б. Капелли, Джералд Р. Цисевски ; [перевод с английского]. – Москва.: НПО Источник долголетия, 2008. – 160 с. : ил. – ISBN 978-5-7380-0276-2. – URL: <https://www.bioastin.ru> (дата обращения: 03.03.2016).
32. Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) / G. Chen, B. Wang, D. Han [et al.]. – DOI: 10.1111/tpj.12713. // *Plant Journal*. – 2015. – № 81. – P. 95 – 107. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/tpj.12713>. – Дата публикации 1 января 2015.
33. Oroian, M. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis / M. Oroian, I. Escriche. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>. // *Food Research International*. – 2015. – Vol. 74. – P. 10 – 36. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996915001817?via%3Dihub>. – Дата публикации: 18 апреля 2015.
34. The cyanobacterial photoactive orange carotenoid protein is an excellent singlet oxygen quencher / A. Sedoud, R. López-Igual, Ateeq ur Rehman [et al.]. – DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.114.123802>. // *Plant Cell*. – 2014. – № 4 (26) – P. 1781–1791. – URL: <http://www.plantcell.org/content/plantcell/26/4/1781.full.pdf>. – Дата публикации: 18 апреля 2014.
35. Toomey, M.B. Immune-system activation depletes retinal carotenoids in house finches / M.B. Toomey, M.W. Butler, K.J. McGraw. – DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.041004>. // *Journal of Experimental Biology*. – 2010. – № 213 (10). – P. 1709 – 1716. – URL: <https://www.public.asu.edu/~kjmcmgraw/pubs/JEB2010.pdf> (дата обращения: 03.03.2016).

36. Effects of carotenoids, immune activation and immune suppression on the intensity of chronic coccidiosis in greenfinches / T. Sepp, U. Karu, E. Sild [et al.]. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.12.004>. // *Experimental Parasitology*. – 2011. – № 127 (3). – P. 651-657. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489410003577?via%3Dihub>. – Дата публикации: 19 марта 2011.
37. Kim, G.Y. Lycopene suppresses the lipopolysaccharide-induced phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells through inhibition of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB / G.Y. Kim, J.H. Kim, S.C. Ahn. – DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01945.x>. // *Immunology*. – 2004. – № 113(2). – P. 203 – 211. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2567.2004.01945.x>. – Дата публикации: 23 августа 2004.
38. Chew, B.P. Carotenoid action on the immune response / B.P. Chew, J.S. Park. – DOI: <https://academic.oup.com/jn/article/134/1/257S/4688304>. // *Journal of Nutrition*. – 2004. – № 134. – P. 257 – 261. – URL: <https://www.pubfacts.com/detail/14704330/Carotenoid-action-on-the-immune-response>. – Дата публикации: 1 января 2004.
39. Fiedor, J. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease / J. Fiedor, K. Burda. – DOI:10.3390/nu6020466. // *Nutrients*. – 2014. – Vol.2, №6. – P. 466 – 488. – URL: https://www.researchgate.net/publication/259959639_Potential_Role_of_Carotenoids_as_Antioxidants_in_Human_Health_and_Disease. – Дата публикации: 27 января 2014.
40. UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners / K.-H. Nguyen M. Chollet-Krugler, N. Gouaulta, S.Tomasi. – DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c3np70064j>. // *Natural Product Reports*. – 2013. – № 12 (30). – P. 1490 – 1508. – URL: <http://www.biomedsearch.com/nih/UV-protectant-metabolites-from-lichens/24170172.html>. – Дата публикации: 30 октября 2013.
41. Krinsky, N. Carotenoids in health and disease / N. Krinsky, S. T. Mayne, H. Sies – New York: Dekker, 2004. – P. 503 – 518. – URL: <http://bookfi.net/book/1035319> (дата обращения: 17.07.2010).
42. Santos, M. S. Short- and long-term beta-carotene supplementation do not influence T cell-mediated immunity in healthy elderly persons / M. S. Santos, L.S.

Leka, J.D. Ribaya-Mercado. – DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/66.4.917>. // American Journal of Clinical Nutrition. – 1997. – Vol. 66. – P. 917 – 924. – URL: <https://academic.oup.com/ajcn/article/66/4/917/4655984>. – Дата публикации: 1 октября 1997.

43. Van der Horst-Graat, J. M. Plasma carotenoid concentrations in relation to acute respiratory infections in elderly people. – DOI: <http://dx.doi.org/10.1079/BJN20041155>. / J. M. Van der Horst-Graat, F. J. Kok, E. G. Schouten // British Journal of Nutrition. – 2004. – №92. – P. 113 – 118. – URL: <https://www.pubfacts.com/detail/15230994/Plasma-carotenoid-concentrations-in-relation-to-acute-respiratory-infections-in-elderly-people>. – Дата публикации: 9 марта 2007.

44. Beal, M.F. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration / M. F. Beal. – DOI: <https://doi.org/10.1002/ana.20624>. // Annals Neurology. – 2005. – №58(4). – P. 495 – 505. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ana.20624#accessDenialLayout>. – Дата публикации: 21 сентября 2005.

45. Perry, V.H. Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease / V.H. Perry, C. Cunningham, D. Boche. // Curr Opin Neurol. – 2002. – № 15 – P. 349 – 354. – URL: <http://www.biomedsearch.com/nih/Atypical-inflammation-in-central-nervous/12045736.html>. – Дата публикации: 26 июля 2002.

46. Dietary beta-cryptoxanthin and inflammatory polyarthritis: results from a population-based prospective study / D. J. Pattison [et al.] . – DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/82.2.451>. // American Journal of Clinical Nutrition. – 2005. – № 82. – P. 451 – 455. – URL: <https://academic.oup.com/ajcn/article/82/2/451/4863001>. – Дата публикации: 1 августа 2005.

47. Cerhan, J.R. Antioxidant micronutrients and risk of rheumatoid arthritis in a cohort of older women / J.R. Cerhan. – DOI: <https://doi.org/10.1093/aje/kwf205>. // American Journal of Epidemiology. – 2003. – №157. – P. 345 – 354. – URL: <https://academic.oup.com/aje/article/157/4/345/78686>. – Дата публикации: 15 февраля 2003.

48. Tomita, Y. Augmentation of tumor immunity against syngeneic tumors in mice by beta-carotene / Y. Tomita, K. Himeno, K. Nomoto. // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1987. – № 78. – P. 679 – 681. – URL: <http://www.biomedsearch.com/nih/Augmentation-tumor-immunity-against-syngeneic/3470543.html> (дата обращения: 03.03.2016).
49. Jyonouchi, H. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. – / H. Jyonouchi, S. Sun, K. Iijima. // *Nutrition and Cancer*. – 2003. – № 6(1). – P. 59 – 65. – URL: <https://ru.scribd.com/document/366263146/Antitumor-Activity-of-Astaxanthin-and-Its-Mode-of-Action-pdf> (дата обращения: 03.03.2016).
50. Chew, B.P. Dietary lutein inhibits mouse mammary tumor growth by regulating angiogenesis and apoptosis / B. P. Chew, C. M. Brown, J. S. Park. // *Anticancer Research*. – 2003. – № 23. – P. 3333-3339. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12926072> (дата обращения: 03.03.2016).
51. Prakash, P. In vitro inhibition of proliferation of estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells treated with carotenoids or retinoids / P. Prakash, R.M. Russell, N.I. Krinsky. – DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1574>. // *Nutrition Journal*. – 2001. – №131. – P. 1574 – 1580. – URL: <https://academic.oup.com/jn/article/131/5/1574/4686848>. – Дата публикации: 1 мая 2001.
52. Nomenclature of carotenoids. IUPAC Commission of the Nomenclature of Organic Chemistry and the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. // *Pure and Applied Chemistry*. – 1975. – P. 407 – 431. – URL: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iupac/carot/> (дата обращения: 17.07.2010).
53. Бриттон, Г. Биохимия природных пигментов / Г. Бриттон. – Москва.: Мир, 1986. – 422 с. – URL: <https://nashol.com/2011072357716/biohimiya-prirodnih-pigmentov-britton-g.html> (дата обращения: 17.07.2010).
54. Winters, Y.D. Identification of carotenoids in ancient salt from death valley, saline valley, and searles lake, california, using laser raman spectroscopy / Y.D. Winters, T.K. Lowenstein, M.N. Timofeeff. – DOI: <http://doi.org/10.1089/ast.2012.0952>. // *Astrobiology*. – 2013. – Vol. 13. – №11. – P. 1065 –1080. – URL:

<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ast.2012.0952>. – Дата публикации: 27 ноября 2013.

55. Carotenoids Handbook / G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. – DOI: 10.1007/978-3-0348-7836-4. – Basel: Birkhäuser, 2003. – 671 p. – URL: https://www.researchgate.net/publication/266034790_Carotenoids_Handbook (дата обращения: 07.05.2010).

56. Barba, F.J. Bioactive components from leaf vegetable products / F.J. Barba, M.J. Esteve, A. Frígola. – DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63294-4.00011-5>. // Studies in Natural Products Chemistry. – 2014. – Vol. 41. – P. 321 – 346. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444632944000115> ?via%3Dihub (дата обращения: 03.03.2016).

57. Han, D. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications / D. Han, Q. Hu, Y. Li. – DOI: <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.2.131>. // Algae. – 2013. – Vol. 28, №2. – P. 131 – 147. – URL: <https://www.e-algae.org/journal/view.ph> (дата обращения: 03.03.2016).

58. Milborrow, B.V. Stereochemical aspects of carotenoid biosynthesis. – DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-026224-6.50024-3>. / B.V. Milborrow // Carotenoid chemistry and biochemistry. – 1981. – P. 2027 – 2039. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080262246500243> (дата обращения: 17.07.2010).

59. Hernandez-Marin, E. Cis-Carotenoids: colorful molecules and free radical quenchers / E. Hernandez-Marin, A. Martínez, A. Galano. – DOI: <https://doi.org/10.1021/jp401647n>. // Journal of Physical Chemistry B: Biophysical Chemistry, Biomaterials, Liquids, and Soft Matter. – 2013. – Vol. 117, № 15. – P. 4050 – 4061. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jp401647n>. – Дата публикации: 5 апреля 2013.

60. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ : МР 2.3.1.1915-04 : официальное издание : Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

- от 02 июля 2004 г. : дата введения 2014.07.02 – Москва., 2004. – 44 с.– URL:<http://files.stroyinf.ru/data2/1/4293846/4293846547.htm> (дата обращения: 03.03.2016).
61. Miriana, Durante Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from pumpkin (*Cucurbita* spp.): A Review / Miriana Durante, Marcello Salvatore Lenucci, Giovanni Mita. – DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms15046725>. // *Int. J. Mol. Sci.*– 2014. – №15. – С. 6725-6740. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/15/4/6725>. – Дата публикации: 21 апреля 2014.
62. Гаджиева, А.М. Современные способы получения и применения ликопина / А.М. Гаджиева, С.З. Саидалиева. // Сборник XI Международного научно-практического конкурса, МЦНС «Наука и просвещение», 2017. – С. 80 – 84. – ISBN 978-5-907012-58-5. – URL: <https://naukaip.ru/wp-content/uploads/2017/11/%D0%9A-68-%D0%A1%D0%B1%D0%BE%D1%80%D0%BD%D0%B8%D0%BA.pdf> (дата обращения: 18.11.2018).
63. Muntean, E. Quantification of carotenoids from pumpkin juice by HPLC-DAD / E. Muntean. – DOI: <https://www.researchgate.net/publication/265926394> // *Scientific Researches. Agroalimentary Processes and Technologies.* – 2005. – Vol.11. – №1. – P. 123 – 128. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/265926394> (дата обращения: 17.07.2010).
64. Juliana Julian, Torres Gama Comparison of carotenoid content in tomato, tomato pulp and ketchup by liquid chromatography / Juliana Julian Torres Gama, Antonio Carlos Tadiotti, Celia Maria de Sylos. // *Alimentos and Nutrition.* – 2006. – Vol. 17, №4. – P. 353 –358. – URL: https://mafiadoc.com/comparison-of-carotenoid-content-in-tomato-tomato-pulp-and-unesp_5aa584d91723dddece17d971.html (дата обращения: 17.07.2010).
65. Goñi, I. Bioaccessibility of beta-carotene, lutein, and lycopene from fruits and vegetables / I. Goñi, J. Serrano, F. Saura-Calixto. – <https://doi.org/10.1021/jf0609835>. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 2006. – Vol.15. – P. 5382 – 5387. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0609835>. – Дата публикации: 4 июля 2006.

66. Копытько, Я. Ф. Применение, химический состав и стандартизация сырья и препаратов *Urtica* (обзор) / Я.Ф. Копытько, Е.С. Лапинская, Т.А. Сокольская. // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – № 10. – С. 32 – 41.
67. Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health / El-Sayed M., Abdel-Aal, Humayoun Akhtar, Khalid Zahee, Rashida Ali. – DOI: doi:10.3390/nu5041169. // *Nutrients*. – 2015 – №5 (4) – P. 1169 – 1185. URL: <https://www.mdpi.com/2072-6643/5/4/1169>. – Дата публикации: 9 апреля 2013.
68. Zaccari, F. In vitro bioaccessibility of betacarotene, Ca, Mg and Zn in landrace carrots (*Daucus carota*, L.) / F. Zaccari, M.C. Cabrera, A. Ramos, A. Saadoun. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.051>. // *Food Chem.* – 2015. – №166. – P. 365 – 371. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614009376?via%3Dihub>. – Дата публикации: 1 января 2015.
69. Плод облепихи свежий: [фармакопейная статья]. – Москва., 2007. – 7 с.
70. Antioxidant capacity of crude extracts containing carotenoids from the berries of various cultivars of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) / M. Kruczek¹, A. Świdorski¹, A. Mech-Nowak¹, K. Król. – DOI: 10.18388/abp.2012_2189. // *Acta biochimica Polonica*. – 2012. – Vol. 59, №1. – P. 135 – 137. – URL: [https://www.researchgate.net/publication/221716540_Antioxidant_capacity_of_crude_extract_...dant_capacity_of_crude_extract_..._containing_carotenoids_from_the_berries_of_various_cultivars_of_Sea_buckthorn_Hippophae_rhamnoides_L](https://www.researchgate.net/publication/221716540_Antioxidant_capacity_of_crude_extract_...) (дата обращения: 03.03.2016).
71. Исследование каротиноидного состава мякоти тыкв / Л.А. Дейнека, И.А. Гостищев, В.И. Дейнека. [и др.] // Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки. – 2011. – №9 (104). – С. 131 – 136. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_16870455_26623361.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
72. Robert, G. Fassett Astaxanthin in cardiovascular health and disease / Robert G. Fassett, Jeff Coomers. – DOI: 10.3390/molecules17022030. // *Molecules*. – 2012. – Vol. 17. – P. 2030 – 2048. – URL:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6268807/>. – Дата публикации: 20 февраля 2012.

73. Коломиец, Н.Э. Стандартизация листьев крапивы двудомной / Н.Э. Коломиец, Г.И. Калинин, Н.Н. Сапронова. // Фармация. – 2011. – №6. – С. 22 – 24.

74. Ушанова, В.М. Исследование влияния условий произрастания на химический состав крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) / В.М. Ушанова, О.И. Лебедева, С.М. Репях. // Химия растительного сырья. – 2001. – №3. – С. 97 – 104.

75. Патент №2438360 Российская Федерация, МПК А23L 1/33 (2006.01). Способ экстракции липидов (варианты), экстракт липидов криля и полная липидная фракция (варианты) : № 2009109083/13 : заявл.: 12.03.2009: опубл. 10.01.2012 / Прочанкина О.А. – URL: <http://www1.fips.ru>. (дата обращения: 16.05.2013).

76. Патент №2236441 Российская Федерация, МПК С11В1/10, А23L1/30, А23К1/10, А61К35/60. Способ экстракции липидов, экстракт липидов криля и полная липидная фракция : № 2001113503/13 : заявл. 21.10.1999 : опубл. 20.03.2003. / Бодуан Адриен, Мартэн Женеви́ев. – URL: <http://www1.fips.ru>. (дата обращения: 16.05.2013).

77. Заявка №2001113503 Российская Федерация, МПК А01К 61/00(2004.09), А23D 9/007(2004.09), А23D 9/02(2004.09), А23К 1/10(2004.09), А23К 1/16(2004.09), А23L 1/30(2004.09), А61К 8/67(2004.09), А61К 8/96(2004.09), А61К 8/98(2004.09), А61К 35/56(2004.09), А61Р 9/00(2004.09), А61Р 13/12(2004.09), А61Q 19/00(2004.09), С11В 1/00(2004.09), С11В 1/10(2004.09), С11В 5/00(2004.09), В 11/00(2004.09), С11В 13/00(2004.09). Способ экстракции липидов, экстракт липидов криля и полная липидная фракция : № 2001113503 : заявл. 21.10.1999 : опубл. 20.03.2003 / Бодуан Адриен, Мартэн Женеви́ев.– URL: <http://www1.fips.ru>. (дата обращения: 16.05.2013).

78. Патент №2531940 Российская Федерация, МПК G01N 33/15 (2006/01), G01N 21/25 (2006/01) Способ спектрофотометрического количественного определения в листьях крапивы двудомной при совместном присутствии хлорофилла,

каротиноидов и гидроксикоричных кислот : № 2013117181/15 : заявл. 15.04.2013 : опубл. 27.10.2014. / Тринеева О.В., Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И., Воропаева С.В.– URL: <http://www1.fips.ru>. (дата обращения: 16.05.2013).

79. Промышленная микробиология / под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высш. шк., 1989. – С. 310 – 322. – URL: <http://bookfi.net/book/530855> (дата обращения: 16.05.2013).

80. Заявка № 99120113 Российская Федерация, МПК С12N 15/09(2002.12), С12N 1/14(2002.12), С12N 1/16(2002.12), С12N 1/20(2002.12), С12N 9/00(2002.12), С12N 9/16(2002.12), С12N 9/26(2002.12), С12N 9/92(2002.12), С12N 15/01(2002.12), С12N 15/55(2002.12), С12N 15/61(2002.12), С12P 1/00(2002.12), С12P 7/64(2002.12), С12P 17/06(2002.12), С12P 17/14(2002.12), /18(2002.12), С12P 19/62(2002.12), С12P 21/04(2002.12), С12P 23/00(2002.12), С12P 35/00(2002.12), С12P 37/00(2002.12), С12R 1/465(2002.12), С12R 1/82(2002.12). Ферментативное получение полезных соединений в промышленном масштабе с использованием средств с определенным химическим составом : № 99120113 : заявл. 20.02.1998 : опубл. 27.12.2002 / Де Лат Вильхельмус Теодорус Антониус Мария, Престинг Йоханнес Корнелис Герардус, Кукман Бертус Питер. – URL: <http://www1.fips.ru>. (дата обращения: 16.05.2013).

81. Novel carotenoid pyropheophorbide A esters from abalone / Maoka Takashi, Etoh Tetsuji, Akimoto Naoshige, Yasui Hiroyuki. – DOI:10.1016/j.tetlet.2011.03.146. // Tetrahedron Lett. – 2011. Vol. 23. – P. 3012 – 3015. – URL: https://www.researchgate.net/publication/233731197_Novel_carotenoid_pyropheophorbide_A_esters_from_abalone – Дата публикации: 7 апреля 2011.

82. Заявка №2003108882 Российская Федерация, МПК С12P 23/00 (2004.12). Продуцирование каротиноидов из одноуглеродного субстрата : №2003108882 : заявл. 04.09.2001 : опубл. 10.12.2004 / Бжостович Патрисия К., Ченг Квионг, Дикосимо Диана Дж. [и др.]. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).

83. Заявка № 2004126703 Российская Федерация, МПК C12N 1/21(2005.06) , A23K 1/00(2005.06), A23K 1/16(2005.06), A23K 1/18(2005.06), A23L 1/28(2005.06), A23L 1/30(2005.06), C12N 1/14(2005.06), C12N 15/01(2005.06), C12P 23/00(2005.06), C12R 1/645(2005.06). Способ получения астаксантина путем ферментации отобранных штаммов *Xanthophyllomyces Dendrorhous* : №2004126703 : заявл. 03.02.2003 : опубл. 10.06.2005 / Де ла Фуенте Морено Хуан Луис, Пейро Сесон Энрике, Диес Гарсия Бруно [и др.]. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).
84. Заявка № 2005125072 Российская Федерация, МПК C12N 1/15(2006.06), A23K 1/16(2006.06), A23L 1/275(2006.06), A23L 1/28(2006.06), A23L 1/30(2006.06), A61Q 90/00(2006.06), C12N 15/11(2006.06), C12N 15/63(2006.06), C12N 15/80(2006.06), C12P 23/00(2006.06). Способ получения каротиноидов или их предшественников с помощью генно-инженерно видоизмененных микроорганизмов семейства *Blakeslea*, полученные указанным способом : заявл. 09.01.2004 : опубл. 10.06.2006 / Матушек Маркус, Кляйн Даниэла, Хайнекамп Торстен [и др.]. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).
85. Заявка № 2011110739 Российская Федерация, МПК C12N 1/16(2014.09), C12M 1/00(2014.09), A23K 1/00(2014.09). Способ культивирования клеток дрожжей *Phaffia Rhodozyma* для получения белкововитаминной добавки, содержащей каротиноид астаксантин : заявл. 22.03.2011: опубл. 27.09.2012 / Герман Л.С., Вустин М.М., Жаворонков В.А. [и др.]. –URL: доступа: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).
86. Патент № 2385925 Российская Федерация, МПК C12N 1/16 (2006.01), C12P 23/00 (2006.01), C12N 15/01 (2006.01). Штамм дрожжей *Phaffia rhodozyma* – продуцент астаксантина : № 2008141520/13 : заявл. 22.10.2008 : опубл.10.04.2010 / Вустин М.М., Белых Е.Н., Кишилова С.А. [и др.]– URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).
87. Заявка № 95104293 Российская Федерация, МПК C09B 61/00(1996.12). Способ получения ликопина : заявл. 22.03.1995 : опубл. 10.12.1996 / Ивакин

А.Ф., Феофилова Е.П., Киселева А.И. [и др.]. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).

88. Патент №2115678 Российская Федерация, МПК C09B 61/00(1998.07), C12P 23/00(1998.07). Способ получения ликопина : заявл. 13.11.1997; опубл. 20.07.1998 / Феофилова Е.П. , Терешина В.М., Меморская А.С. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).

89. Патент №2211862 Российская Федерация, МПК C12N 1/14(2003.09), C12N 1/16(2003.09), C12P 5/02(2003.09), C12P 23/00(2003.09), C12R 1/645(2003.09). (-)-Штамм гетероталличного фикомицета *Blakeslea trispora*, продуцирующий ликопин в паре с разными (+)-штаммами *Blakeslea trispora*, и способ микробиологического синтеза ликопина : №2001129106/13 : заявл. 29.10.2001 : опубл.10.09.2003 / Акишина Р.И., Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П. [и др.]. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).

90. Патент №2126806 Российская Федерация, МПК C09B 61/00, C12P 23/00. Способ получения кристаллического ликопина : № 2004119099/13 : заявл. 28.05.1996 : опубл. 27.02.1999 / Гаврилов А.С., Ивакин А.Ф., Медведева В.И. [и др.]. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).

91. Патент №2284992 Российская Федерация, МПК C07C45/28, C07C403/24. Способ получения ксантофилла : № 2003133993/04 : заявл. 18.04.2002 : опубл. 2006 / Кеснель Янник, Флашер Ришар. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).

92. Заявка №2008110066 Российская Федерация, МПК C07C 49/653(2009.09). Кристаллические формы астаксантина : заявл. 15.08.2006 : опубл. 27.09.2009 / Ли Мэтью Луис Стивен. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).

93. Заявка №94017353 Российская Федерация, МПК A61K 35/78(1996.08). Способ получения ликопина и лекарственный препарат ликопина : заявл. 11.05.1994 : опубл. 10.08.1996 / А.Б. Капитанов, Л.Е. Муратова, А.М. Пименов, О.А.Нестерова. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).

94. О возможности извлечения каротиноидов из зеленой массы *Amarantus cruentu* L. в процессе получения из нее белковых концентратов / А.А. Кулаков,

Н.В. Бикмулина, С.Ф. Племенкова, И.А. Чернов. // Растительные ресурсы. – 1995. – № 2. – С. 67 – 70.

95. Исследование химического состава серпухи венценосной, культивируемой в Сибири / А.С. Ангаскиева, В.Ю. Андреева, Г.И. Калинкина [и др.]. // Химия растительного сырья. – 2003. – № 4. – С. 47 – 50. – URL: http://www.chem.asu.ru/chemwood/volume7/2003_04/0304_047.pdf (дата обращения: 16.05.2013).

96. Исследование химического состава отходов переработки пихтовой лапки / О.Н. Ухов, В.Н. Буркова, Г.И. Калинкина, Г.А. Терентьева. // Химия растительного сырья. – 2006. – № 1. – С. 55 – 58. – URL: http://www.chem.asu.ru/chemwood/volume10/2006_01/0601_055.pdf (дата обращения: 16.05.2013).

97. Лекарственные растения государственной фармакопеи. Фармакогнозия. / Под ред. И.А. Самылиной, В.А. Северцева. – Москва.: АНМИ, 2003. – 534 с. – URL: <https://dlib.rsl.ru/01000712226> (дата обращения: 16.05.2013).

98. Носов, А.М. Лекарственные растения / А.М. Носов. – Москва.: ЭКСМО – Пресс, 2001. – 348 с. – URL: <https://search.rsl.ru/ru/record/01000635494> (дата обращения: 16.05.2013).

99. Заявка №2006132336 Российская Федерация, МПК С09В 61/00(2008.03), А23L 1/275(2008.03), А23L 1/30(2008.03), А23L 1/302(2008.03), А61К 8/30(2008.03), А61К 8/31(2008.03), А61К 8/34(2008.03), А61К 8/35(2008.03), А61К 31/015(2008.03), А61Р 9/00(2008.03), А61Р 35/00(2008.03), А61Q 19/00(2008.03), А61Q 19/08(2008.03). Композиции, содержащие цис-изомеры каротиноидного соединения, и способ их получения : заявл. 08.02.2005 : опубл. 20.03.2008 / Бортлик Карлхайнц. – Режим доступа: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).

100. Патент №2172608 Российская Федерация, МПК А23L1/212. Способ получения ликопина : № 2000125003/13 : заявл. 04.10.2000 : опубл. 27.08.2001 / Газиев А.И. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).

101. Патент №2436771 Российская Федерация, МПК C07C 403/24(2011.12), C07C 45/78(2011.12). Способ выделения ксантофиллов из растительного сырья : № 2010133213/04 : заявл. 06.08.2010 : опубл. 20.12.2011 / Дейнека Л.А., Дейнека В.И., Гостищев И.А. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).
102. Патент №1557716 Российская Федерация, МПК A61K35/78. Способ получения концентрата каротиноидов : заявл. 11.04.1988 : опубл. 20.05.1995 / Носовская Т.Л., Ветров П.П., Прокопенко А.П. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).
103. Патент №98110054 Российская Федерация, МПК C07C 403/24(2000.02). Концентраты природных каротиноидов из растительного материала и способ их получения : № 98110054/04 : заявл. 27.05.1998 : опубл. 20.02.2000 / Лехел Кош [и др.]. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).
104. Патент №2520992 Российская Федерация, МПК C11B1/00. Технологическая линия безотходной переработки облепихи : заявл. 19.03.2013 : опубл. 27.06.2014 / Мухортов С.А., Евглевский М.В., Смирнов В.П. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).
105. Марковская, Е.Ф. Пигментный аппарат высших растений приливно-отливной зоны северных морей / Е.Ф. Марковская, А.А. Корзунина, Н.Ю. Шмакова. // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: материалы III международной конференции с элементами школы для молодых ученых, аспирантов и студентов, 22 июня - 26 июня 2010 г., Петрозаводск. – Петрозаводск : Карельский научный центр РАН, 2010. – С. 110 – 111. – URL:http://resources.krc.karelia.ru/krc/doc/publ2010/biochemistry_109-111.pdf (дата обращения: 16.05.2013).
106. Патент №2050388 Российская Федерация, МПК A23J 1/00(1995.12), A22C 29/02(1995.12), A23J 1/04(1995.12), A23L 1/056(1995.12), C09B 61/00(1995.12). Способ переработки астаксантинсодержащего сырья с извлечением астаксантина и родственных ему каротиноидов: заявл.15.11.1989 : опубл. 20.12.1995/ Гуннар Микалсен. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).

107. Патент №2438360 Российская Федерация, МПК A23L 1/33(2012.01). Природная композиция биологически активных веществ из панцирных отходов креветки определенного цикла развития, получение, использование (варианты) : № 2009109083 : заявл. 12.03.2009 : опубл. 20.09.2010 / Прочанкина О.А. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).
108. Патент №2179816 Российская Федерация, МПК A23L 1/33(2002.02), A61K 35/60(2002.02). Способ комплексной переработки панцирей ракообразных гидробионтов : № 99111711/13 : заявл. 01.06.1999 : опубл. 10.06.2001 / Новиков В.Ю., Харзова Л.П. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).
109. Патент №2284992 Российская Федерация, МПК C07C45/28, C07C403/24. Способ получения ксантофилла : № 2003133993/04 : заявл. 18.04.2002 : опубл. 10.05.2005 / Кеснель Я., Флашер Р. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16 мая 2013).
110. Патент №2093151 Российская Федерация, МПК A61K35/78. Способ предотвращения инактивации ликопина : заявл. 27.07.1995 : опубл. 20.10.1997 / Капитанов А.Б., Муратова Л.Е., Пименов А.М. –URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).
111. Заявка №2006116475 Российская Федерация, МПК C07C 35/21(2007.11), A23L 1/275(2007.11), C07C 35/08(2007.11), C07C 403/24(2007.11), C09B 61/00(2007.11). Способ выделения, очистки и составления стабильной товарной лютеиновой пасты из эфирного масла : заявл. 17.01.2005 : опубл. 20.11.2007 / Баскаран Сунил, Мохан В. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).
112. Заявка №2009108341 Российская Федерация, МПК A23L 1/303(2010.09), A61K 31/07(2010.09). Устойчивые и биологически доступные композиции изомеров каротиноидов для кожи и волос : заявл. 07.08.2007 : опубл. 20.09.2010 / Бортлик Карлхайнц, Ламбеле Пьер, Ришелль Мирьям. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).
113. Патент №97103582 Российская Федерация, МПК A61K 31/07(1999.04). Стабильный водный солюбилизиат каротиноида и витамина : № 97103582/14 :

заявл. 11.03.1997 : опубл. 20.04.1999 / Карл Кольтер, Франк Рунге. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 16.05.2013).

114. Harold, C. Furr Analysis of retinoids and carotenoids: problems resolved and unsolved / C. Harold. – DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/134.1.281S>. – Text : electronic // Journal of Nutrition. – 2004. – №134. – P. 281 – 285. – URL: <https://academic.oup.com/jn/article/134/1/281S/4688308>. – Дата публикации: 1 января 2004.

115. Tiziani, S., Profiling of carotenoids in tomato juice by one- and two-dimensional NMR / S. Tiziani, S.J. Schwartz, Y. Vodovotz. – DOI: <https://doi.org/10.1021/jf061154m>. // Journal of agricultural and food chemistry. – 2006. – №16. – P. 6094 – 6100. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf061154m>. – Дата публикации: 7 июля 2006.

116. Britton, G. Carotenoids Handbook / G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. – DOI: 10.1007/978-3-0348-7836-4. – Basel AG.: Springer, 2004. – 646 p. – URL: <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-0348-7836-4> (дата обращения: 07.05.2010).

117. Государственная фармакопея Российской Федерации. – 13 изд.: в 3 т. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации. – Москва, 2015. – URL: <http://www.femb.ru/feml> (дата обращения: 17.07.10).

118. Baranski, R. Changes in carotenoid content and distribution in living plant tissue can be observed and mapped in situ using NIR-FT-Raman spectroscopy / R. Baranski, M. Baranska H. Schulz. – DOI: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-005-1566-9>. // Planta – 2005. – №3. – P. 448 – 457. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00425-005-1566-9>. – Дата публикации: 9 июля 2005.

119. FT-IR study of some seco- and apocarotenoids / Lorand T., P. Molnár J. Deli, G.Tóth. // Journal of biochemical and biophysical methods. – 2002. – Vol. 53. – №1 – 3. P. 251 – 258. – URL: <https://www.pubfacts.com/detail/12406607/FT-IR-study-of-some-seco-and-apo-carotenoids> (дата обращения: 16.05.2013).

120. Писарев, Д.И. Разработка экспресс-метода определения каротиноидов в сырье растительного происхождения / Д.И. Писарев, О.О. Новиков, Т.А. Романова. // Научные ведомости БелГУ. – 2010. – № 22. – С. 119 – 122. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_15584390_88120705.pdf (дата обращения: 16.05.2013).
121. Ultrafast time-resolved absorption spectroscopy of geometric isomers of carotenoids / Dariusz M. Niedzwiedzki, Daniel J Sandberg, Hong Cong [et al.]. // *Chemical Physics*. – 2009. – № 357. – P. 4 – 16. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2823300/>. – Дата публикации: 23 февраля 2009.
122. Laura, Perez-Fons Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers / Laura Perez-Fons, Sabine Steiger, Reena Khaneja. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2010.12.009>. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2011. – №1811. – P. 177 – 185. – URL: <http://sporegen.com/uploads/publications/BBA.pdf>. – Дата публикации: 5 января 2011.
123. Дейнека, В.И. Сезонная динамика накопления астаксантина в лепестках *Adonis Aestivalis* (Ranunculaceae) при выращивании в условиях черноземной зоны России (г. Белгород) / В.И. Дейнека, А.А. Сиротин, Л.А. Дейнека. // *Растительные ресурсы*. – 2007. – №4. – С. 75 – 82.
124. Спектральный и хроматографический анализ ксантофиллов в различных растительных добавках и их влияние на накопление лютеина и зеаксантина в желтке перепелиных яиц / В.И. Дейнека, А.А. Шапошников, Л.А. Дейнека [и др.]. // Научные ведомости БелГУ. – 2010. – № 21.– С. 143 – 149. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_15584327_66028573.pdf (дата обращения: 16.05.2013).
125. Fatimah, A.M.Z. Identification of carotenoid composition in selected ulam or traditional vegetables in Malaysia / A.M.Z. Fatimah, M.H. Norazian, O. Rashidi. // *International Food Research Journal*. – 2012. – №2. – P. 527 – 530. – URL:

[http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20\(02\)%202012/\(22\)IFRJ-2012%20Rashidi.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20(02)%202012/(22)IFRJ-2012%20Rashidi.pdf) (дата обращения: 16.05.2013).

126. Чечета, О.В. Стабильность каротиноидов в растительных маслах при хранении / О.В. Чечета, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин. // Фармация. – 2008. – №2. – С. 12 – 14.

127. Гергель, А.В. Спектрофотометрическое определение количественного содержания хлорофиллов и каротиноидов в некоторых растениях представителей рода *Moringaceae* при использовании разных экстрагентов / А.В. Гергель. // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. – 2010. – Вып. 64. – С. 25 – 27.

128. Красноштанова, А.А. Получение каротиноидов из биомассы бактерий *Halobacterium halobium* в условиях комплексной переработки микробного сырья / А.А. Красноштанова, К.А. Тимошенко. // Биофармацевтический журнал. – 2014. – Т.6, № 3. – С. 3 – 8.

129. Ульяновский, Н.В. Разработка экспрессных методов аналитической экстракции каротиноидов из растительного сырья / Н.В. Ульяновский, Д.С. Косяков, К.Г. Боголицын. // Химия растительного сырья. – 2012. – № 4. – С. 147 – 152. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_18834502_25383279.pdf (дата обращения: 16.05.2013).

130. Delia, B. Rodriguez-Amaya A guide to carotenoid analysis in foods / Delia B. Rodriguez-Amaya.– Washington: Copyright HarvestPlus, 2001. – P. 14 – 19. – URL: <http://www.beauty-review.nl/wp-content/uploads/2014/11/A-guide-to-carotenoid-analysis-in-foods.pdf> (дата обращения: 16.05.2013).

131. Delia, B. Rodriguez-Amaya HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis / Delia B. Rodriguez-Amaya, Mieko Kimura. – Washington.: Copyright HarvestPlus, 2004. – 59 p. – URL: <https://www.ebah.com.br/content/ABAAAAQg4AJ/harvestplus-handbook-for-carotenoid-analy-sis> (дата обращения: 17.07.2010).

132. Сергунов, Е.В. Исследование по стандартизации плодов шиповника / Е.В. Сергунов, А.А. Сорокина. // Фармация. – 2011. – №11. – С. 12 – 15.

133. Методики идентификации различных пигментов и количественного спектрофотометрического определения суммарного содержания каротиноидов и белка в фитомассе *S.platensis* (Nords.) Geilt. / С.В. Первушкин, В.А. Куркин, А.В. Воронин [и др.]. // Растительные ресурсы. – 2002. – №1. – С. 112 – 119 .
134. Юнусова, Ф.М. Эколого-географическая изменчивость плодов *Piprorhae Rhamnoides* L. по содержанию токоферолов и каротиноидов / Ф.М. Юнусова, А.Ш. Рамазанов, К.М. Юнусов. // Вестник Дагестанского государственного университета. – 2012. – № 1.– С 191 – 196. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_17650034_13865487.pdf (дата обращения: 16.05.2013).
135. Оленников, Д.Н. Разработка технологии получения сухого экстракта какалии копьевидной / Д.Н. Оленников, Л.М. Танхаева, Г.Г. Николаева. // Химия растительного сырья. – 2004. – №3. – С. 53 – 58. – URL: http://www.chem.asu.ru/chemwood/volume8/2004_03/0403_053.pdf (дата обращения: 16.05.2013).
136. Yanshan, Niu Polymorphism identification of carotenoid binding protein gene transcription in the silkworm, *Bombyx mori* / Yanshan Niu, Feifei Long, Yanghu Sima, Shiqing Xu. – <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2012.32016>. // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 3. – P. 107-114. – URL: https://www.scirp.org/pdf/ABB20120200010_82231617.pdf. – Дата публикации: 18 апреля 2012.
137. Analysis of β -carotene in carrot by spectrophotometry / P. Karnjanawipagul, W Nittayanuntawech, Piyanuch Rojsanga, Leena Suntornsuk. // *Mahidol University Journal of pharmaceutical science*. – 2010. – Vol. 37. – №1-2. – P. 8 – 16. – URL: https://pharmacy.mahidol.ac.th/journal/_files/2010.08-16.pdf (дата обращения: 16.05.2013).
138. Rosdina, Rahiman Carotenoids concentration detection investigation: a review of current status and future trend / Rosdina Rahiman, Mohd Alauddin Mohd Ali, Mohammad Syuhaimi Ab-Rahman. – DOI: 10.7763/IJBVB.2013.V3.257. // *International Journal of bioscience, biochemistry and bioinformatics*. – 2013. – Vol. 3. – №5. – P. 446 – 472. – URL: <http://www.ijbbb.org/papers/257-E00025.pdf> (дата обращения: 16.05.2013).

139. Separation and identification of carotenoids in flowers of *chelidonium majus* L. and inflorescences of *solidago canadensis* / G. Horvath, P. Molnar, A. Farkas [et al.]. – DOI: 10.1365/s10337-010-1510-4. // Full Short Communication. – 2010. – №3. – P. 1 – 6. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1365/s10337-010-1510-4>. – Дата публикации: 3 апреля 2010.
140. Дороднева, В.И. Идентификация каротиноидов листьев грецкого ореха (*Juglan sregia* L.) методами спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии / В.И. Дороднева. // Растительные ресурсы. – 1967. – №2. – С. 266 – 268.
141. Сергеева, Н.В. Качественное и количественное изучение каротиноидов в некоторых галеновых препаратах / Н.В. Сергеева, Н.Д. Захарова. // Фармация. – 1977. – №1. – С. 34 – 38.
142. Биологически активные вещества антиязвенного растительного средства «Вентрофит» / П.Б. Лубсандоржиева, Т.А. Ажунова, Л.Н. Шантанова [и др.]. // Химия растительного сырья. 2006. № 1. С. 59-64. – URL:http://www.chem.asu.ru/chemwood/volume10/2006_01/0601_059.pdf (дата обращения: 16.05.2013).
143. Кисличенко, В.С. Анализ липофильных фракций листьев и веток *Armeniasa vulgaris* / В.С. Кисличенко, Л.В. Упыр, О.А. Пузан. // Химия природных соединений. – 2007. – № 6. – С. 571.
144. Чечета, О.В. Изучение хроматографических характеристик β -каротина в тонком слое сорбента / О.В. Чечета, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин. // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т.46, №5. – С. 54 – 56.
145. Дейнека, В.И. Каротиноиды и антоцианы листков околоцветников некоторых видов лилий (*Lilium* L.) / В.И. Дейнека, Н.А. Лабунская, О.А. Сорокопудова. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – №.5. – С. 819 – 825. – URL: <http://www.sorpchrom.vsu.ru/articles/20080514.pdf> (дата обращения: 16.05.2013).
146. Усмонова, Ш.Х. Каротиноиды семян *Bunium persicum* (Boiss.) V. Fedtsch., произрастающего в Таджикистане / Ш.Х. Усмонова, Д.Э. Ибрагимов, Ш.Х. Халиков. // Доклады академии наук Республики Таджикистан. – 2010. – №5. – С.

377 – 381. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_15557490_39031045.pdf (дата обращения: 16.05.2013).

147. Дроздова, И.Л. Изучение содержания каротиноидов в траве короставника полевого (*Knautia arvensis* (L.) Coult.) семейства ворсянковые (*Dipsacaceae* Juss.) / И.Л. Дроздова, Н.Н. Денисова. // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. Пятигорск. – 2010. – С. 39 – 40.

148. Оленников, Д.Н. Исследование химического состава алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.) / Д.Н. Оленников, И.Н. Зилфикаров, Т.А. Ибрагимов. // Химия растительного сырья. – 2010. – №3. – С.77 – 82. – URL: http://www.chem.asu.ru/chemwood/volume14/2010_03/1003_077.html (дата обращения: 16.05.2013).

149. De Leenheer, A. P. Modern chromatographic analysis of vitamins / De Leenheer A. P., Lambert W. E., Van Bocxlaer J. F. – Basel.: Marcel Dekker, 2000. – P. 19. – URL: <http://bookfi.net/book/832113> (дата обращения: 16.05.2013).

150. Bunea, C.-I. Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitisvinifera*) cultivated in organic and conventional systems / C.-I. Bunea, N. Pop, A. C.Babeş. – DOI: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-66>. // Chemistry Central Journal. – 2012. – Vol. 6, №66. – P. 3 – 9. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1186/1752-153X-6-66>. – Дата публикации: 4 июля 2012.

151. Tinoi, J. Determination of major carotenoid constituents in petal extracts of eight selected flowering plants in the north of thailand / J. Tinoi, N. Rakariyatham R.L. Deming. // Chiang Mai J. Sci. – 2006. – Vol. 33, №2. – P. 327 – 334. – URL: <http://www.thaiscience.info/Journals/Article/CMJS/10905778.pdf>. – Дата публикации: 15 мая 2006.

152. Garcia-de Blas, E. Free and esterified carotenoids in ornaments of an avian species: the relationship to color expression and sources of variability / E. Garcia-de Blas, R.Mateo, J. Vinuela. // Physiological and Biochemical Zoology. – 2013. – Vol.86, №5. – P. 483 – 498. – URL: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/671812>. – Дата публикации: 14 августа 2013.

153. Lutnaes Bjart Frode On the structure of carotenoid iodine complexes / Lutnaes Bjart Frode, J. Krane, S. Liaaen-Jensen. // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2004. – Vol.2, №19. – P. 2821 – 2828. – URL: <http://www.biomedsearch.com/nih/structure-carotenoid-iodine-complexes/15455156.html>. – Дата публикации: 8 сентября 2004.
154. Determination of lycopene, α -carotene and β -carotene in serum by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with selected ion monitoring / T. Hagiwara T. Yasuno, K. Funayama, S. Suzuki. // *Journal of Chromatography B*. – 1998. – Vol. 708. – P. 67 – 73. – URL: <https://docslide.net/documents/determination-of-lycopene-carotene-and-carotene-in-serum-by-liquid-chromatographyatmospheric.html> (дата обращения: 17.07.10).
155. Mata-Gomez, L.C. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview / L.C. Mata-Gomez, J.C. Montanez, A. Mendez-Zavala, C.N. Aguilar. – DOI: 10.1186/1475-2859-13-12. // *Microbial Cell Factories*. – 2014. – Vol.13, №12. – P. 1 – 12. – URL: <http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/12>. – Дата публикации: 21 января 2014.
156. Тимошенко, К.А. Исследование процесса выделения каротиноидов из галофильных бактерий *Halobacterium halobium* / К.А. Тимошенко. // *Успехи в химии и химической технологии*. – 2011. – Т. 25, №10. – С. 36 – 40. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_20229957_62467629.pdf (дата обращения: 16.05.2013).
157. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry / Ayerim Hernández-Almanza, Julio Cesar Montanez, Miguel A. Aguilar-González [et al.]. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.11.007>. // *Food Bioscience*. – 2014. – Vol. 5. – P. 64-72. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2212429213000849#!> (дата обращения: 16.05.2013).
158. Weber, R.W.S. Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, fungi) / R.W.S. Weber, H. Anke, P. Davoli. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.052>. // *Journal of Chromatography A*. – 2007. – Vol.1145, №1-2. – P. 118 – 122. – URL:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307000969?via%3Dihub>. – Дата публикации: 18 января 2007.

159. Inbaraj, B.S. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa* / B.S. Inbaraj, J.T. Chien, B.H. Chen. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.10.055>. // *Journal of Chromatography A*. – 2006. – Vol.1102, №1-2. – P. 193 – 199. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730502039X?via%3Dihub>. – Дата публикации: 18 ноября 2005.

160. Bhagavathy, S. Evaluation of antigenotoxic effects of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* using human lymphocytes / S. Bhagavathy, P. Sumathi. – DOI:10.1016/S2221-1691(11)60203-7. // *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. – 2012. – Vol. 2, №2. – P. 109 – 117. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3609264/pdf/apjtb-02-02-109.pdf>. – Дата публикации: 28 февраля 2012.

161. Dietary acquisition of photoprotective compounds (mycosporine-like amino acids, carotenoids) and acclimation to ultraviolet radiation in a freshwater copepod / Robert E. Moeller, Shawna Gilroy, Craig E. Williamson, Gabriella Grad. – DOI: <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.2.0427>. // *Limnol. Oceanogr.* – 2005. – Vol.50, №2. – P. 427 – 439. – URL: <https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.4319/lo.2005.50.2.0427>. – Дата публикации: 17 марта 2005.

162. Effect of the cauliflower or transgene on carotenoids accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers / A.B. Lopez, J. Van Eck, B. J. Conlin [et al.]. – DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erm299>. // *Journal of Experimental Botany*. – 2008. – Vol. 59, №2. – P. 213 – 223. – URL: <https://academic.oup.com/jxb/article/59/2/213/536635>. – Дата публикации: 5 февраля 2008.

163. Pilbrow, J. Carotenoid-binding proteins; accessories to carotenoid function / J. Pilbrow, D. Garama, A. Carne. – DOI: 10.18388/abp.2012_2197. // *Paper in Press*. – 2012. – Vol. 59, №190. – С. 1 – 3. – URL:

- https://www.researchgate.net/publication/221716549_Carotenoidbinding_proteins_accessories_to_carotenoid_function. – Дата публикации: 17 марта 2012.
164. Barua, A.B. Improved normal-phase and reversed-phase gradient HIGH-performance liquid chromatography procedures for the analysis of retinoids and carotenoids in human serum, plant and animal tissues / A.B. Barua. // *Journal of Chromatography A*. – 2001. – Vol. 936, №1-2. – P. 71 – 82. – URL: <http://www.biomedsearch.com/nih/Improved-normal-phase-reversed-gradient/11761007.html>. – Дата публикации: 12 ноября 2001.
165. Analysis of lycopene geometrical isomers in biological microsamples by liquid chromatography with coulometric array detection / M.G. Ferruzzi, M.L. Nguyen; L.C. Sander [et al.]. // *J. of Chromatography B: Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. – 2001. – Vol. 760, №2. – P. 289 – 299. – URL: <http://www.biomedsearch.com/nih/Analysis-lycopene-geometrical-isomers-in/11530988.html>. – Дата публикации: 3 сентября 2001.
166. Sommerburg, O. Simultaneous detection of carotenoids and vitamine in human plasma / O. Sommerburg, L.-Y. Zang, F.J.G.M. Van Kuijk. // *Journal of Chromatography B: Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. – 1997. – Vol. 695, №2. – P. 209 – 215. – URL: https://www.researchgate.net/publication/263224905_Simultaneous_detection_of_carotenoids_and_vitamin_E_in_human_plasma (дата обращения: 16.05.2013).
167. Quantitative structure-activity relationship study on the antioxidant activity of carotenoids. / Y.-J. Sun, Y.-J. Sun, J. Pang [et al.]. – DOI : 10.2174/1389557054023233. // *Chinese Journal of Structural Chemistry*. – 2009. – Vol. 28, №2. – P. 163 – 170. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/7768630> (дата обращения: 16.05.2013).
168. Identification of 3-Methoxyzeaxanthin as a Novel Age-Related Carotenoid Metabolite in the Human Macula / P. Bhosale, D.Y. Zhao, B. Serban, P.S. Bernstein. – DOI: 10.1167/iovs.06-1046. // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2007. – Vol. 48, №4. – P. 1435 – 1440. – URL: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2126149> (дата обращения: 16.05.2013).

169. Quantitative measurement of 3'-oxolutein from human retina by normal-phase high-performance liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / P. Bhosale, P.S. Bernstein. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.07.006>. // *Analytical Biochemistry*. – 2005. – Vol. 345, №2. – P. 296 – 301. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269705005166?via%3Dihub>. – Дата публикации: 15 октября 2005.
170. Рыбкина, Е.М. Исследование каротиноидов и токоферолов препарата «Бальзам Облепиховый» / Е.М. Рыбкина, А.Н. Шавлинская, Л.Г. Маслов. // *Решение актуальных задач фармации на современном этапе*, 1994. – С. 217.
171. Дейнека, В.И. Обращенно-фазовая ВЭЖХ в анализе растительных масел. Метод контроля подлинности и установления фальсификации облепихового масла / В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, В.Н. Сорокопудов. // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2009, Т.43. – №1. – С. 33 – 36.
172. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. – Москва.: Федеральный центр госэпиднадзора Минздрава России, 2004. – С. 51-58. – URL: <http://mbionika.ru/d/734143/d/r4.1.1672-03rukovodstvopometodamkontrolyakachestvai bezopasnostibiologicheskiiaktivnykhdoxa.pdf> (дата обращения: 16.05.2013).
173. Акентьева, Н.П. Ингибирование инвазивности раковых клеток под действием синтетических пептидов (Gegeeege и dfgeeeae) / Н. П. Акентьева, С. С. Шушанов. // *Биологические мембраны*. – 2017, Т. 34, № 1. – С. 19–31. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_28107207_12617165.pdf (дата обращения: 18.11.2018).
174. Functional properties of carotenoids originating from algae / E. Christaki, E. Bonos, I. Giannenas, P. Florou-Paneri. – DOI: 10.1002/jsfa.5902. // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2013. – Vol. 93, № 1. – P. 5 – 11. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jsfa.5902>. – Дата публикации: 9 октября 2012.
175. Avalos, J. Biological roles of fungal carotenoids / J. Avalos, Limón M. Carmen. // *Current Genetics*. – 2015. – Vol. 61, № 3. – P. 309 – 324. URL: – <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00294-014-0454-x>. – Дата публикации: 5 октября 2004.

176. Gammone, M.A. Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin / M.A. Gammone, N. D'Orazio. – DOI: <https://doi.org/10.3390/md13042196>. // *Marine Drugs*. – 2015. – Vol. 13, № 4. – P. 2196 – 2214. – URL: <https://www.mdpi.com/1660-3397/13/4/2196>. – Дата публикации: 23 декабря 2014.
177. Дайронас, Ж.В. Природные нафтохиноны: перспективы медицинского применения / Ж.В. Дайронас, И.Н. Зилфикаров. – Щёлково: Издательство Мархотин П.Ю., 2011. – 252 с. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_20423058_59343392.pdf (дата обращения: 18.11.2018).
178. Коновалов, Д.А. Природные полиацетиленовые соединения / Д.А. Коновалов. // *Фармация и фармакология*. – 2014 – Т. – 2, № 4(5). – С. 23 – 47. – URL: <https://www.pharmpharm.ru/jour/article/view/39/65> (дата обращения: 18.11.2018).
179. Постраш, Я.В. Микрокапсулирование в фармации – современное состояние и перспективы / Я.В. Постраш, О.М. Хишова. // *Вестник фармации*. – 2010. – №2 (48). – С. 1 – 7. – URL: https://elib.vsmu.by/bitstream/123/7270/1/vf_2010_2_73-79.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
180. Леонова, М.В. Современные лекарственные формы и системы доставки лекарственных средств (часть 2) / М.В. Леонова, Ю.Б. Белоусов. // *Клиническая фармакология и терапия*. – 2009. – №18 (2). – С. 62 – 69. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23181940_14745767.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
181. Солодовник, В.Д. Микрокапсулирование / В.Д. Солодовник. – Москва.: Химия, 1980. – С. 108 – 190. – URL: <https://booksee.org/book/476571>.
182. Быковская, Е.Е. Применение технологии инкапсулирования в различных отраслях промышленности / Е.Е. Быковская, А.А. Кролевец. // *Известия ЮЗГУ. Серия Физика и химия*. – 2012. – № 2 – С. 137 – 140. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_21032421_37516305.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
183. Кролевец, А.А. Применение нано- и микрокапсулирования в фармацевтике и пищевой промышленности часть I. Основы микрокапсулирования / А.А. Кролевец, Ю.А. Тырсин, Е.Е. Быковская. // *Вестник российской академии*

естественных наук. – 2012. – №4. – С. 123 – 127. URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23639783_84778115.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

184. Муруева, А.В. Получение резорбируемых микрочастиц, содержащих цитостатический препарат, методом распылительного высушивания и исследование их свойств / А.В. Муруева, А.М. Шершнева. // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2016. – №1 (9). – С. 75 – 87. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_25792353_34869973.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

185. Литвишко, В.С. Микрокапсулированные пестициды на основе полиуретанов / В.С. Литвишко, О.В. Литвишко. // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2016. – № 6(1). – С 50 – 53. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_26141951_69103372.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

186. Механизм комплексообразования белков молочной сыворотки с хитозаном / В.П. Варламов, С.А. Лопатин, Л.Р. Алиева [и др.]. // Молочная промышленность. – 2014. – №1. – С. 68 – 70. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_21158782_89958169.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

187. ДНК-вакцины: конструирование защитных препаратов против лихорадки долины рифт (обзор) / О.В. Капустина, Н.Н. Власова, Т.Э. Южук [и др.]. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012. – № 12. – С. 54 –59. – URL: [http://vestnik.ulsau.ru/upload/iblock/48e/vestnik-2012-1\(17\).pdf](http://vestnik.ulsau.ru/upload/iblock/48e/vestnik-2012-1(17).pdf) (дата обращения: 03.03.2016).

188. Капсулирование пероксидазы хрена и иммуноферментного конъюгата с целью использования его в иммуноферментном анализе / М.В. Ковалькова, О.В. Воробьева, С.С. Аванесян [и др.]. // Научное обозрение. Биологические науки. – 2014. – № 1. – URL: <http://biology.science-review.ru/ru/article/view?id=76>. (дата обращения: 03.03.2016).

189. Шамсара, О. Микрокапсулы на основе низкометилированных пектинов и концентрата белков молочной сыворотки / О. Шамсара, З.К. Мухидинов, Д.Т.

- Бобокалонов [и др.]. // Доклады академии наук Республики Таджикистан. – 2014. – Т. 57, №1. – С. – 44 –50. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/316351972> (дата обращения: 03.03.2016).
190. Научное обоснование применения микрокапсулированных пробиотических препаратов в животноводстве / Д.В. Трубников О.Б. Сеин, А.А. Кролевец, В.А. Стариков. // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 4. – С. 62 – 65. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23829694_33160226.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
191. Микрокапсулы из поли(3-гидроксibuтирата) для пролонгированного высвобождения белка / А.П. Зернов, Е.А. Иванов, Т.К. Махина и [и др.]. // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7, №4. – С. 50 – 57. – URL: <http://www.stm-journal.ru/ru/numbers/2015/4/1191/pdf> (дата обращения: 03.03.2016).
192. Иммобилизация гемоглобина в полиэлектролитные капсулы / М. В. Ковалькова, Э.Н. Пшеничная, О.В. Воробьева, С.С. Аванесян. // Вестник Ставропольского государственного университета. –2011. – Т.74. – С. 34-39. – URL: <http://vestnik.stavsu.ru/Jornal/74-2011.html> (дата обращения: 03.03.2016).
193. Шамсоро, О. Микрокапсулы на основе пектина подсолнечника и концентрата белков молочной сыворотки / О. Шамсоро, Х.И. Тешаев, З.К. Мухидинов. // Известия академии наук Республики Таджикистан. Отделение физико-математических, химических, геологических и технических наук. – 2012. – №2 (147). – С. 1 –7. – URL: <https://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1031305> (дата обращения: 03.03.2016).
194. Микрокапсулы на основе цитрусовых пектинов и лактоглобулина молочной сыворотки / З.К. Мухидинов, С.Р. Усманова, З.Б. Шарифова [и др.]. // Известия академии наук республики Таджикистан. Отделение физико-математических, химических, геологических и технических наук. – 2010. – №2 (139). – С. 68 – 74. – URL: <https://elibrary.ru/contents.asp?issueid=925594> (дата обращения: 03.03.2016).
195. Грехнёва, Е.В. Особенности микрокапсулирования некоторых лекарственных препаратов в альгинат натрия / Е. В. Грехнёва, Т. Н. Кудрявцева. //

Auditorium: электронный научный журнал Курского государственного университета. – 2014. №3. – URL: <https://elibrary.ru/contents.asp?issueid=1341061> (дата обращения: 03.03.2016).

196. Разработка технологии микрокапсулированной формы на основе натрия альгината / Д.А. Манина, Б.Б. Сысуев, М.О. Обухова, О.А. Погибельная. // Современная фармация: проблемы и перспективы развития: сборник материалов V межрегиональной научно-практической конференции с международным участием / под редакцией Ф.Н. Бидаровой. – Владикавказ.: Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова, 2015, с. 207 – 210. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_25371396_67868783.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

197. Хитозан для фармации и медицины / Д. А. Сливкин, В.Л. Лапенко, О.А. Сафонова [и др.]. // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2011. – № 2. – С. 214 – 232. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_17111036_64638802.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

198. Оригинальная биотехнология получения матриц, содержащих маннан и фукоидан, для фармацевтических целей / Е.В. Денисова, И.В. Бегдай, С.Ф. Андрусенко [и др.]. // Наука. Инновации. Технологии. – 2014. – № 3. – С. 157 – 166. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23458195_26372048.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

199. Новые биополимерные композиции для получения капсулированных пищевых добавок / И.А. Глотова, Е.Н. Макаркина, Е.Е. Курчаева, М.В. Проняева // Известия вузов. Пищевая технология. – 2012. – № 4. – С. 13 – 16. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_17929250_95260445.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

200. Хотимченко, Ю.С. Углеводные биополимеры для адресной доставки белковых препаратов, нуклеиновых кислот и полисахаридов / Ю.С. Хотимченко. // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2014. – № 2. – С. 5 – 13. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_22002277_33087441.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

201. Балабушевич, Н.Г. Включение белков в полиэлектролитные микрокапсулы из декстран сульфата, протамина и меламина формальдегида / Н.Г. Балабушевич, Г.Б. Сухоруков, Н.И. Ларионова. // Вестник Московского университета. Серия. 2. Химия. – 2002. – Т. 43, № 6. – С. 374 – 377. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_5223008_89926583.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
202. Наханов, А.К. Оптимальные параметры микроинкапсуляции бета-клеток и гепатоцитов / А.К. Наханов, Н.Т. Битов, С.М. Мамадалиев. // Биотехнология. Теория и практика. – 2009. – №1. – С. 70 – 75. URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_25284710_27197396.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
203. Наханов, А.К. Микрокапсуляция культуральных островковых клеток поджелудочной железы / А.К. Наханов. // Биотехнология. Теория и практика. – 2007. – №1. – С. 71 – 75. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_24914817_71400887.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
204. Микрокапсулирование ДНК и перспективы использования в вирусологии / С.Ю. Белов, О.Е. Селина, А.С. Каталымов, О.В. Зиновьева. // Ветеринарная патология. – 2007. – № 4. – С. 81 – 84. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_16862422_28583047.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
205. Микрокапсулированные мультиклеточные опухолевые сфероиды: получение и использование в качестве модели in vitro для тестирования лекарств / А.М. Цой, Д.С. Зайцева-Зотова, Э.Ф. Эдельвейс [и др.]. // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, Вып. 6. – С. 674 – 685. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_15289818_44469277.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
206. Петухова, Е.В. Перспективность использования микрокапсулированных пробиотических культур в пищевой промышленности / Е.В. Петухова, А.Ю. Крыницкая. // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – № 22 (17). – С. 257 – 260. – URL: <http://www.kstu.ru/event.jsp?id=23840> (дата обращения: 03.03.2016).

207. Изучение возможности микрокапсулирования бактериофага / Н.А. Ковязина, А.М. Николаева, Е.В. Функнер, М.Г. Ефимова. // Научные ведомости БелГУ Серия Медицина. Фармация. – 2014. – № 24 (195). – С. 205 – 210. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_22932194_49271676.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
208. Быковская, Е.Е. Влияние на свойства риванола с помощью процесса микрокапсулирования в водорастворимые полимеры / Е.Е. Быковская, А.А. Кролевец. // Известия ЮЗГУ. Серия Физика и химия. – 2013. – № 1. – С. 79 – 89. – URL: <https://swsu.ru/izvestiya/seriesphysic/archiv/1-2013.pdf> (дата обращения: 03.03.2016).
209. Грехнёва, Е.В. Получение и анализ микрокапсул фурацилина в водорастворимых полимерах / Е.В. Грехнёва, О.Ю. Домашева. // Всероссийский журнал научных публикаций. – 2013. – №5 (20). – С. 5 – 8. – URL: <https://docslide.net/documents/-5750a9b21a28abcf0cd23f19.html> (дата обращения: 03.03.2016).
210. Микрокапсулирование 4-карбоксихакридон в водорастворимые полимеры / Ю.Д. Маркович Е.В. Грехнёва , С.А. Ефанов , О.П. Юдина. // Ученые записки Курского государственного университета. – 2013. – №3 (27). – URL: www.scientificnotes.ru/pdf/032-002.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
211. Разработка детской лекарственной формы на основе микрокапсул с метронидазолом / Н.В. Автина, Д.И. Писарев, И.В. Спичак, [и др.]. // Научные ведомости БелГУ Серия Медицина. Фармация. – 2011. – №4 (99). – Выпуск 13. – С. 170 – 176. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_16135798_12808053.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
212. Полковникова, Ю.А. Возможности создания пролонгированных лекарственных форм афобазола (обзор) / Ю.А. Полковникова, Э.Ф. Степанова. // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2011. – Т. 4, № 13. – С. 190 – 193. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_16135801_64940926.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
213. Полковникова, Ю.А. Экспериментальное обоснование технологических параметров микрокапсулирования афобазола методом математического

планирования эксперимента / Ю.А. Полковникова, Э.Ф. Степанова. // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2014. – № 2. – С. – 121– 124. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_21724128_42873513.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

214. Полковникова, Ю.А. Разработка состава микрокапсулированной лекарственной формы / Ю.А. Полковникова, Н.Н. Драчева. // Успехи современного естествознания. – 2014. – №5. – С.122 – 124. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_21567977_28514382.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

215. Патент № 2522222 Российская Федерация, МПК А61К 9/50(2014.07), А61К 31/4184(2014.07), В01J 13/06(2014.07). Способ инкапсуляции фенбендазола : № 2012137377/15 : заявл. 31.08.2012 : опубл.10.07.2014 / Быковская Е.Е., Кролевец А.А.. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 03.03.2016).

216. Патент №2523400 Российская Федерация, МПК А61К31/60, А61К9/50, А61К 9/52, В01J13/06. Способ получения микрокапсул лекарственных препаратов группы цефалоспоринов в конжаковой камеди в ацетоне : № 2012133381 : заявл. 03.08.2012 : опубл. 10.02.2014/ Быковская Е.Е., Кролевец А.А.. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 03.03.2016).

217. Патент № 2522254 Российская Федерация, МПК В01J13/06, А61К9/50, А61К 9/52, А61К31/545. Способ получения микрокапсул лекарственных препаратов группы цефалоспоринов в альбумине человеческого сывороточном : № 2012126428/15 : заявл. 25.06.2012 : опубл.10.07.2014 / Быковская Е.Е., Кролевец А.А.. – URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 03.03.2016).

218. Разработка микрокапсулированных и гелеобразных продуктов и материалов для различных отраслей промышленности / М.С. Вилесова, Н.И. Айзенштадт, М.С. Босенко [и др.]. // Российский химический журнал (Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева). – 2001.– Т. XLV, № 5 – 6. – С. 1 – 10. – URL: <http://www.chem.msu.ru/rus/jvho/2001-5-6/125.pdf> (дата обращения: 03.03.2016).

219. Микрокапсулирование пигментов фталоцианинового ряда химическими и физико-химическими методами / Ю.Д. Маркович, Е.В. Грехнёва, С.А. Ефанов, О.П. Юдина. // Известия Курского государственного технического университета. – 2009. – № 2 (27). – С. 50. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_13520245_49499642.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
220. Включение экстрактов лекарственных растений в биodeградируемые микрокапсулы / Т.Н. Бородина, Л.Д. Румш, С.М. Кунижев [и др.]. // Биомедицинская химия. – 2007. – Т.53, Вып. 6. – С. 662 – 671. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_12514449_15322549.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
221. Разработка состава и технологии микрокапсул с экстрактом черемухи поздней / Н.В. Автина, Д.И. Писарев, О.О. Новиков [и др.]. // Современные проблемы науки и образования.–2012.–№ 4. – URL: <http://www.science-education.ru> (дата обращения: 03.03.2016).
222. Соловьёва, Н.Л. Технологии повышения стабильности полифенольных соединений в лекарственных препаратах (обзор) / Н.Л. Соловьёва, М.С. Сокуренок. // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – №4 (17). – С. 81 – 91. – URL: <https://www.pharmjournal.ru/jour/article/view/159/157> (дата обращения: 03.03.2016).
223. Научное обоснование создания новых лекарственных форм пробиотиков (обзор литературы и результаты собственных экспериментов) / П.А. Гордиенко, В.И. Чуешов, А.Д. Гордиенко, Е.В. Кудогоцева. // Научные ведомости БелГУ Серия Медицина. Фармация. – 2015. – № 22 (219). – Вып. 32. – С. 121 – 127. – URL: http://dspace.bsu.edu.ru/bitstream/123456789/23826/1/Gordienko_Nauchnoe.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
224. Симоненко, С.В. Функциональные продукты детского и геродиетического питания и инновационные технологии / С.В. Симоненко, В.А. Исаев. // Пищевая индустрия. – 2015. – №4(26). – С. 22–26. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_25101028_15362374.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

225. Белкин, Ю.Д. Микрокапсулирование ингредиентов для функциональных продуктов питания / Ю.Д. Белкин, В.С. Литвишко, Е.В. Москалев. // Сборник трудов РЭУ им. Г.В. Плеханова. – Москва, 2009. – С. 66. https://sibac.info/sites/default/files/archive/2012/innovacii_13.03.2012.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
226. Патент № 014369 (13) В1, Евразийская патентная организация, МПК А23L 1/00 (2006.01), А23L 1/217 (2006.01), А23L 1/39 (2006.01), А23L 1/40 (2006.01), А23L 1/212 (2006.01), А23L 1/33 (2006.01), А23С 19/082 (2006.01), 3L 1/164 (2006.01), А23L 1/31 (2006.01), А23L 1/22 (2006.01), А21D 13/00 (2006.01), А23С 11/10 (2006.01), А23G 3/34 (2006.01), А23L 1/16 (2006.01), А23С 9/13 (2006.01). Пищевой продукт, содержащий микрокапсулу для доставки полезного вещества, и способ доставки полезного вещества : № 200800269 : завл. 2006.06.23 : опубл. 2008.08.29 / Маттсон Пит Х, Горски Ричард А., Фонг Бренда И. [и др.]– URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 03.03.2016).
227. Патент № 2006108860 Российская Федерация, МПК А61К 9/56(2009.06), А61J 3/07(2009.06), В01J 13/02(2009.06), А23L 1/00(2009.06). Микрокапсулы : № 2006108860/15 : заявл. 06.08.2004 : опубл. 27.06.2009 / Койн Б., Д. Фараэр, С. Гуен [и др.]– URL: <http://www1.fips.ru> (дата обращения: 03.03.2016).
228. Микро- и наночастицы на границе раздела фаз при капсулировании / С.Б. Айдарова, А.Б. Тлеуова, А.А. Шарипова [и др.]. // Известия национальной академии наук Республики Казахстан Серия: Химия и технология. – 2015. – №4 (412). – С. 72 – 82. – URL: http://nblib.library.kz/elib/library.kz/Jurnal/%D0%A5%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%8F_04-2015/S%20Aidarova%20A%20Tleuova.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
229. Обогащение кисломолочных продуктов микрокапсулированным β-каротином / О.В. Димова, А.В. Баерле, П.Г. Татаров, Е.Н. Кирица. // Молочная промышленность. – 2013. – № 9. – С. 42 – 43. – URL: <https://www.twirpx.com/file/1819304/> (дата обращения: 03.03.2016).
230. Шполянская, И.Ю. Анализ и моделирование информационных систем для малого бизнеса: Монография / И.Ю. Шполянская.– Ростов-на-Дону.: РГЭУ

- «РИНХ», 2005. – 162 с. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_25143824_35748879.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
231. Дэвид А., Марка Методология структурного анализа и проектирования SADT / Дэвид А. Марка, Клемент МакГоуэн, 1986. – 231 с. – URL: <http://www.pqm-online.com/assets/files/lib/books/marka.pdf> (дата обращения: 03.03.2016).
232. Усков, А.А. Подход к оценке сложности диаграмм SADT (IDEF0) / А.А. Усков, А.Г. Жукова. // Программные продукты и системы / Software & Systems. – 2015. – №1(109). – С. 34 – 37. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23286230_27840096.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
233. Информационные технологии поддержки жизненного цикла продукции. Методология функционального моделирования. Р 50.1.028-2001. – Москва.: Госстандарт России, 2001. – 54 с. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200028629> (дата обращения: 03.03.2016).
234. Рябухин, С.И. О необходимости согласования связей в функциональных SADT-моделях / С.И. Рябухин. // Вестник НГУ. Серия: Информационные технологии. – 2016. – Т.14, № 2. – С. 122 – 133. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_27033618_58972604.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
235. Классификация информационных технологий / В.Н. Волкова, А.Ю. Васильев, А.А. Ефремов, В.Н. Юрьев. // Открытое образование. – 2015. – №5. – С. 16 – 24. – URL: <https://openedu.rea.ru/jour/article/view/51/53> (дата обращения: 03.03.2016).
236. Доронина, И.Н. Проектирование функциональной модели муниципальной библиотеки / И.Н. Доронина, С.В. Лондарь. // Научные и технические библиотеки. – 2016. – № 4. – С. 5–15. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_25793799_23294503.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
237. Комаров, В.Ф. Проблемы и методы внедрения управленческих инноваций / В.Ф. Комаров, К.П. Корсунь. // Регион: экономика и социология. – 2011. – №1. – 248 – 267. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_16058487

_26580788.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

238. Барклаевская, Н.В. Два взгляда на анализ предметной области / Н.В. Барклаевская, И.Е. Лахманова. // Фундаментальные и прикладные исследования в современном мире. – 2015. – № 12-1. – С. 83 – 88. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_25316671_94020364.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

239. Заводчиков, Н.Д. Разработка производственной стратегии хлебопекарного предприятия с применением SADT-технологии / Н.Д. Заводчиков, А.С. Землянкина. // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – №2. – С. 10 – 14. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23603120_23894631.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

240. Лобова, Г.Н. SADT-Технология индивидуальной исследовательской деятельности / Г.Н. Лобова. // Современные проблемы науки и образования. – 2009. – №1. – URL: www.rae.ru (дата обращения: 03.03.2016).

241. Лобова, Г.Н. Эффективность SADT – технологии в деятельности студентов / Г.Н. Лобова. // Современные проблемы науки и образования. – 2006. – №1. – URL: www.rae.ru (дата обращения: 03.03.2016).

242. Ахтеров, А.В. Системная модель информационно-образовательной среды выпускающей кафедры вуза / А.В. Ахтеров, О.В. Лезина, И.В. Федоров. // Вестник МАДИ(ГТУ). – 2010. – №12. – С. 10 – 17. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_15242799_95973184.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

243. Доронина, И.Н. Моделирование учебных кластеров с использованием метода структурного анализа и проектирования (SADT) / И.Н. Доронина. // Интеграция образования. – 2014. – №1. – С. 102 – 108. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_21760483_40976998.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

244. Потахин, С.Н. Разработка организационно-технологической модели оказания помощи больным язвенными гастродуоденальными кровотечениями /

- С.Н. Потахин, Ю.Г. Шапкин. // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. – 2017. – Т.7. – № 2. – С. 590 – 600. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_28856237_83175485.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
245. Комплексный подход к реабилитации детей с врожденной расщелиной верхней губы и неба в условиях специализированного центра / О.Ю. Ершова, А.Г. Леонов, А.Е. Ткаченко, Г.В. Долгополова. // Система интеграции в здравоохранении. – 2014. – №1(23). – С. 26 – 35. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23868975_75667703.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
246. Организационно-технологическая модель оказания медицинской помощи больным с ишемической болезнью сердца / Ю.В. Попова, А.Р. Киселев, А.М. Водолазов [и др.]. // Кардио-ИТ. – 2014. – №3. – URL: <http://cardio-it.ru>. –(дата обращения: 03.03.2016).
247. Организационно-технологическая модель оказания медицинской помощи больным с артериальной гипертонией / А.Р. Киселев, А.М. Водолазов, О.М. Посненкова, В.И. Гриднев. // Кардио-ИТ. – 2014. – №3. – URL: <http://cardio-it.ru> (дата обращения:03.03.2016).
248. Организационно-технологическая модель оказания медицинской помощи больным с хронической сердечной недостаточностью / А.Р. Киселев, В.А. Шварц, А.М. Водолазов [и др.]. // Кардио-ИТ. – 2014. – №3. – URL: <http://cardio-it.ru> (дата обращения: 03.03.2016).
249. Ланцберг, А.В. Особенности оценки качества медицинской электронной услуги / А.В. Ланцберг, К. Тройч, Т.И. Булдакова. // Информационное общество. – 2011. – № 4. – С. 28 – 37.– URL: <http://www.infosoc.iis.ru> (дата обращения: 03.03.2016).
250. Азанов, В.Г. Структурно-функциональная модель управления потоками пациентов региональной консультативной поликлиники / В.Г. Азанов. // Системы и средства информации – 2016. – №26. – С. 13 – 29. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_26095455_10930764.pdf (дата обращения: 30.03.2016).

251. Тараник, М.А. Анализ процесса контроля качества оказания медицинской помощи в рамках программы обязательного медицинского страхования / М.А. Тараник, Г.Д. Копаница. // Вестник Томского государственного университета, 2015. – №3(32). – С. 75 – 84. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_24236500_43540933.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
252. Семканова В.А. Качество медицинских услуг и агентное моделирование / В.А. Семканова. // Научные достижения и открытия современной молодёжи: Сборник статей победителей международной научно-практической конференции: в 2 частях. – Пенза: Наука и Просвещение (ИП Гуляев Г.Ю.), 2017. – С. 139 – 143. – URL: <https://naukaip.ru/wp-content/uploads/2018/11/%D0%9C%D0%9A-430-%D0%A1%D0%B1%D0%BE%D1%BD%D0%B8%D0%BA.pdf> (дата обращения: 03.03.2016).
253. Филина, И.А. Моделирование бизнес-процессов в аптечной практике / И.А. Филина, И.М. Раздорская. // Научные ведомости БелГУ Серия Медицина. Фармация. – 2015. – № 4 (201). – Выпуск 29. – С. 136 – 140. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_24113756_51517007.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
254. Логунова, Л.Н. Оптимизация процесса приемки товара на аптечном предприятии / Л.Н. Логунова, Л.В. Устинова, В.Н. Сысойкин. // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С. 83 – 84. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_20191615_74629495.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
255. Козлова, М.С. Технологии управления процессами использования лекарственных препаратов в медицинских кабинетах образовательных организаций / М.С. Козлова. //Пермский медицинский журнал. – 2016. – Т.33. – №1. – С. 97 – 102. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_25591461_81660745.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
256. Неволина, Е. Интегрированный подход: система мотивации + ассортиментный план / Е. Неволина, В. Атаманова. // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской техники – 2012. – № 3 – С. 70 – 75. –

URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_17659488_16845528.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

257. Мельникова, О.А. Моделирование процессов управления службой медицины катастроф территориального уровня и место в ней фармацевтической составляющей / О.А. Мельникова. // Экология человека. – 2011. – №3. – С. 40 – 43. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_16052099_25828225.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

258. Гурьянов, П. С. Организационно-методические подходы к разработке обучающих анимационных фильмов в системе фармацевтического образования / П. С. Гурьянов. // Сибирский педагогический журнал. – 2009. – № 9. – С. 80 – 89. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_16548346_34195687.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

259. Функциональное моделирование в построении технологических схем для мягких лекарственных форм / А.С. Голод, Е.В. Кривовяз, С.А. Кривовяз [и др.]. // Фармация. – 2013. – №5. – С. 35 – 37.

260. Государственный реестр лекарственных средств : официальный сайт. – Москва. – URL: <http://grls.rosminzdrav.ru> (дата обращения: 08.04. 2013).

261. Федеральный реестр БАД : официальный сайт. – Москва. – URL: <http://obad.ru> (дата обращения: 08.04. 2013).

262. Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents / Nayek Sumanta, Choudhury Imranul Haque, Jaishee Nishika, Roy Suprakash. – DOI: 10.1055/s-0033-1340072. // Research Journal of Chemical Sciences. – 2014. – Vol. 4(9). – P. 63 – 69. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/269699354>. – Дата публикации: 18 сентября 2014.

263. Asmare, A.M. Investigation of Microalgae Co-Cultures for Nutrient Recovery and Algal Biomass Production from Dairy Manure / A.M. Asmare, B.A. Demessie, G.S. Murthy. – DOI:10.13031/aea.30.10151. // Applied Engineering in Agriculture. – 2014. – Vol. 30(2). – P. 335 – 342. – URL: <https://studylib.net/doc/11895952/investigation-of-microalgae-co-cultures-for-nutrient-reco> (дата обращения: 03.03.2016).

264. Lichtenthaler, K. Hartmut Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents / Hartmut K. Lichtenthaler, Alan R. Wellburn. – DOI: 10.1042/bst0110591. // Biochemical Society Transactions. – 1983. – Vol. 11(5). – P. 591–592. – URL: <http://www.biochemsoctrans.org/content/11/5/591>. – Дата публикации: 01 октября 1983.
265. Britton, G. Carotenoids. Volume 5: Nutrition and Health / G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. : Basel; Boston; Berlin.: Birkhäuser Verlag, 2009. – с. 464. . – URL: <https://www.springer.com/us/book/9783764375003> (дата обращения:03.03.2016).
266. 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. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_19405140_56157357.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
267. 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.
268. 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 – 365.
269. Colour and carotenoid changes of pasteurised orange juice during storage / S. Wibowo, L. Vervoort, J.Tomic, J. Santiago. // Food Chem. – 2015. – №171.– P. 330 – 340.–URL: https://www.researchgate.net/publication/322406059_Colour_and_carotenoid_changes_of_pasteurised_orange_juice_during_storage (дата обращения: 03.03.2016).
270. Пономарев, В.Д. Экстрагирование лекарственного сырья / В.Д. Пономарев. – Москва.: Медицина. – 1976. – 204 с. : ил.

271. Колдаев, В.М. Физико-химические свойства настоек на свежих и высушенных листьях лекарственных растений / В.М. Колдаев, П.С. Зориков, Г.Н. Бездетко. // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С. 94 – 96. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_20191619_34948251.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
272. Пшуков Ю.Г. Разработка ресурсосберегающей технологии и принципа нормирования качества жидких экстрактов и настоек: специальность 15.00.01 «Технология лекарств и организация фармацевтического дела» : диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук: / Пшуков Юрий Георгиевич – Пятигорск, 1988. – 330 с.
273. Государственная фармакопея СССР. – Вып. 2.– 11-е изд. – Москва.: Медицина, 1989. – 400 с.
274. Охрименко, О.В. Исследование процесса экстракции сухих веществ из хвои сосны. Часть 1. Исследование влияния степени измельчения хвои сосны и экспозиции на интенсивность экстракции / О. В. Охрименко, Д. А. Головлев, И.П. Рыжкова. // Молочно-хозяйственный вестник. – 2011. – № 2. – С. 47 – 51. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_17888927_36568734.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
275. Влияние параметров диспергирования крапивы двудомной (*Urtica Dioica* L.) на изменение степени измельчения, выходов и свойств экстрактивных веществ / Н.В. Юдина, А.А. Иванов, Ю.В. Лоскутова [и др.]. // Химия растительного сырья. – 2012. – №1. – С. 137 – 142. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_17906990_37712685.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
276. Ёршик, О.А. Влияние условий механохимической обработки сырья на экстракцию проантоцианидинов и текстуру корневищ с корнями сабельника болотного / О.А. Ёршик, Г.Н. Бузук. // Вестник фармации. – 2014. – №2 (64). – С. 19 – 25. – URL: https://elib.vsmu.by/bitstream/123/5640/1/vf_2014_2_19-25.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

277. Лежнева, Л.П. Фармако-технологические исследования по расширению области использования крапивы двудомной в медицине : специальность 15.00.01 «Технология лекарств и организация фармацевтического дела» : автореферат диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Лежнева Лариса Петровна. – Пятигорск, 1986. – 23 с.
278. 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.: Изд. СибАК, 2013. – С. 94 – 99. – ISBN 978-5-4379-0318-6.
279. 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.
280. 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. // Евразийский союз ученых (ЕСУ), 2015. – № 7 (16). – С. 98 – 100. – ISSN 2411-6467.
281. 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 регистрации лекарственных средств. – 2014. – Т.6, №1. – С. 54 – 63.
282. Курегян, А.Г. Выбор экстрагента и изучение каротиноидного состава *Cucurbita maxima Duch.* / А.Г. Курегян, С.В. Печинский, С.Л. Аталикова. – Текст : непосредственный // Современные концепции научных исследований: материалы XII международной научно-практической конференции 27 – 28 марта 2015 г. // Евразийский союз ученых (ЕСУ). – 2015. – № 3(12). – С. 155 – 157. – ISSN 2575-799.

283. Пономарев, В.Д. Математические методы в фармации / В.Д. Пономарев, В.Г. Беликов, Н.И. Коковкин-Щербак. – Москва.: Медицина, 1983. – 232 с.
284. Курегян А.Г., Возможности совершенствования технологии получения каротиноидов на этапе экстракции / А.Г. Курегян, Э.Ф. Степанова, С.В. Печинский. // Сборник научных трудов м международной научно-практической конференции «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине», посвященной 85-летию ВИЛАР. – Москва.; Щербинская типография, 2016. – С. 497 –501. –ISBN 987-5-9243-0281-2.
285. Калинкина, О.В. Действие полисахарида крапивы двудомной на физическую работоспособность животных, процессы фагоцитоза и резистентность мембран эритроцитов / О.В. Калинкина, И.А. Сычев. // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2014. – №1. – С. 153 – 158. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_21790323_59063241.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
286. Тринеева, О.В. Идентификация органических кислот методом ТСХ в извлечениях из растительных объектов / О.В. Тринеева, И.И. Сафонова, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2013. – Т.13, Вып. 6. – С. 896 – 901. – URL: http://www.chem.vsu.ru/sorbcr/images/pdf/2013/6/2013_06_20.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
287. Федосеева Л.М., Изучение некоторых фенольных соединений крапивы коноплевой травы, произрастающей на территории Алтайского края / Л.М. Федосеева, В.О. Кирьякова. // Химия растительного сырья. – 2012. – № 2. – С 133 – 138. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_18267712_58198068.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
288. 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.
289. Физиология растений: лабораторный практикум для студентов биологического факультета / А. П. Кудряшов, Т.И. Дитченко, О.В. Молчан [и др.]. – Минск : БГУ, 2011. – URL: <http://www.elib.bsu.by> (дата обращения: 03.03.2016).

290. Сальников, А.И. Физиология и биохимия растений: практикум / А.И. Сальников, И.Л. Маслов. – Пермь: Изд-во ФГБОУ ВПО Пермская ГСХА, 2014. – 300 с. – URL: <https://freedocs.xyz/pdf-469055866>. (дата обращения: 03.03.2016).
291. Степанова, Э.Ф. Возможности совершенствования технологии получения каротиноидов на этапе экстракции / Э.Ф. Степанова, А.Г. Курегян, С.В. Печинский, Жидкова Ю.Ю. // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2017. – №3 (59). – С. 134 – 139.
292. Синютина, С.Е. Экстракция флавоноидов из растительного сырья и изучение их антиоксидантных свойств / С.Е. Синютина, С.В. Романцова, В.Ю. Савельева. // Вестник ТГУ. – 2011.– Т.16, вып.1. – С. 345 – 347. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_16330665_47817361.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
293. Клышев Л.К., Флавоноиды растений (распространение, физико-химические свойства, методы исследования) / Л.К. Клышев, В.А. Бандюкова, Л.С. Алюкина. – Алма-Ата, 1978. – 220 с.
294. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях / М.Н. Запрометов. – Москва.: Наука, 1994. – 240 с.
295. Оптимизация условий выделения хлорофиллов из крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) и спирулины (*Spirulina platensis*) / Д.Р. Каримов, В.В. Макаров, С.О. Кручин [и др.]. // Химия растительного сырья. – 2014. – №4. – С 189 – 196. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23309073_47295510.pdf (дата обращения:03.03.2016).
296. Влияние настоя на основе сбора крапивы, березы и подорожника на интенсивность процессов пероксидации в условиях ультрафиолетового облучения / Н.В. Симонова, В.А. Доровских, М.А.Штарберг, Н.П. Симонова. // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2012. – №44. – С. 90 – 94. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_17766556_86454903.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
297. 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. – ISBN 978-5-89314-812-1.

298. Roulin, A. Genetics of colouration in birds / A. Roulin, A.-L. Ducrest. – <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2013.05.005>. // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. – 2013. – Vol. 24 (6-7). – P. 594 – 608. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952113000712?via%3Dihub>. – Дата публикации: 9 мая 2013.

299. Лурье, Ю.Ю. Справочник по аналитической химии / Лурье Ю.Ю.. – Москва.: Химия, 1979. – 480 с.

300. Курегян, А.Г. Спектрофотометрия в анализе каротиноидов (Обзор) / А.Г. Курегян. // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – №2 (часть 23). – С. 5166 – 5172. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23613408_12919289.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

301. 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.

302. Nuclear magnetic resonance analysis of carotenoids from the burgundy plumage of the Pompadour Cotinga (*Xipholena punicea*) / A.M. LaFountain, C. Pacheco, R.O. Prum, H.A. Frank. – DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2013.08.012>. // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2013. – №539. – P. 133 – 141. – URL: https://prumlab.yale.edu/sites/default/files/lafountain_et_al_2013b.pdf. – Дата публикации: 30 августа 2013.

303. Chromatographic, NMR and vibrational spectroscopic investigations of astaxanthin esters: application to «Astaxanthin-rich shrimp oil» obtained from processing of Nordic shrimps / B. Subramanian, M-H Thibault. Y. Djaoued [et al.]. – doi: 10.1039/c5an01261a. // *Analyst*. – 2015. – №140(21). – P. 7423. – 7433. – URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/AN/C5AN01261A#!divAbstract>. – (дата обращения: 03.03.2016).

304. Хачатуров, А.С. Системный подход к анализу структуры полидиенов по высокочастотным спектрам ЯМР ¹³C / А.С. Хачатуров // Информационный бюллетень РФФИ. Химия. –1996. – №4. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_228406_94956948.htm. – (дата обращения:03.03.2016).
305. Sol, M. Rivera Identification of carotenoids using mass spectrometry in 1 positive ion mode / Sol M. Rivera, Paul Christou, Ramon Canela-Garayoa. – DOI: <https://doi.org/10.1002/mas.21390>. // Mass Spectrom. Rev. – 2014. – №33(5). – P. 353 – 372. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mas.21390>. – Дата публикации: 31 октября 2013.
306. Моисеев, С.В. Использование метода ЯМР-спектроскопии для подтверждения подлинности, идентификации и количественного определения посторонних примесей субстанции салициловой кислоты / С.В. Моисеев, В.И. Крылов, Т.В. Мастеркова. // Ведомости НЦЭСМП. – 2014. – № 1. – С. 15 – 19. – URL: <https://www.vedomostincesmp.ru/jour/issue/viewIssue/22/16> (дата обращения: 03.03.2016).
307. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. – Tsukuba, Ibaraki, Japan : официальный сайт. – URL: <http://sdfs.db.aist.go.jp> (дата обращения:03.03.2016).
308. Further insights on the carotenoid profile of the echinoderm *Marthasterias glacialis* L. / Lilian R. B. Mariutti, D.M. Pereira, Adriana Zerlotti Mercadante [et al.]. – DOI: [doi:10.3390/md10071498](https://doi.org/10.3390/md10071498) // Marini Drugs. – 2012. – № 10. – P. 1498 – 1510. – URL: Mariutti, D.M. Pereira, Adriana Zerlotti Mercadante. – Дата публикации: 12 июля 2012.
309. Mass spectrometry footprinting reveals the structural rearrangements of cyanobacterial orange carotenoid protein upon light activation / H. Liu, H. Zhang, J. D. King [et al.]. – DOI: [10.1016/j.bbabi.2014.09.004](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.09.004). // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. – 2014. – Vol.1837, №12. – P. 1955 – 1963. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25256653>. – Дата публикации: 27 сентября 2014.

310. Pasquale, Crupi Simultaneous HPLC-DAD-MS (ESI+) determination of structural and geometrical isomers of carotenoids in mature grapes / Pasquale Crupi, Rosa Anna Milella, Donato Antonacci. – DOI: <https://doi.org/10.1002/jms.1794>. // *Journal Mass Spectrometry*. – 2010. – №45(9). – P. 971 – 980. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jms.1794>. – Дата публикации: 1 сентября 2010.
311. Качественный состав каротиноидов, активность каталазы и супероксиддисмутазы в тканях двустворчатого моллюска *Anadara Inaequalis* (Bruguiere, 1789) / Солдатов А.А., О.Л. Гостюхина, А.В. Бородина, И.В. Головина. // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. – 2013. – Т. 49. – № 4. – С. 255 – 263. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_19409708_71424233.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
312. MassBank of North America : Официальный сайт. – Обновляется в течение суток. – URL: <http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu> (дата обращения:03.03.2016).
313. Enzell, C.R. Mass spectrometry studies of carotenoids / C.R. Enzell, G.W. Francis, Liaaen-Jensen, S.. – DOI: 10.3891/acta.chem.scand.23-0727. // *Acta Chemica Scandinavica*. – 1969. – Vol. 23. – P. 727 – 750. – URL: http://actachemscand.dk/pdf/acta_vol_23_p0727-0750.pdf(дата обращения:03.03.2016).
314. Rivera, S. M. Identification of carotenoids using mass spectrometry / S. M. Rivera, P. Christou, R. Canela-Garayoa. – DOI: 10.1002/mas.21390. // *Mass spectrometry reviews*. – 2014. – Vol. 33, №5. – С. 353 – 372. – URL: https://www.researchgate.net/publication/258215367_Identification_of_carotenoids_using_mass_spectrometry. – Дата публикации: 31 октября 2013.
315. Raman and infrared spectra of the all-trans, 7-cis, 9-cis, 13-cis and 15-cis isomers of β -carotene / Y. Koyama, I. Takatsuka, M. Nakata, M. Tasumi. – DOI: 10.1002/jrs.1250190107. // *Journal of Raman Spectroscopy*. – 1988. – Vol. 19, №1. – P. 37 – 49. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/230220700> (дата обращения: 03.03.2016).

316. Беллами, Л. Инфракрасные спектры сложных молекул / Л. Беллами. – Москва.: Издательство иностранной литературы, 1957. – 449. – URL: <http://bookre.org/reader?file=484029&pg=2>.
317. Изучение состава липофильных соединений представителей рода боярышник / Н.Н. Гончаров, И.В. Михайлов, Н.Ф. Гончаров, Е.В. Терешонок. // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 11-2. – С. – 357 – 361. – URL: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=35527> (дата обращения: 03.03.2016).
318. Флавоноиды надземной части *Alhagi Canescens* флоры узбекистана / С.З. Нишанбаев, Х.М. Бобакулов, Н.Ю. Бешко [и др.]. – DOI: <https://doi.org/10.14258/jcprm.2017011386> // *Химия растительного сырья*. – 2017. – № 1. – С. 77 – 83. – URL: <http://journal.asu.ru/cw/article/view/1386/1345> (дата обращения: 18.11.2018).
319. Разработка биологически активной добавки на основе экстракта растения иглица понтийская / А.Ф. Хечумян, Л.С. Бехтерев, Л.С. Ходасевич [и др.]. // *Курортная медицина*. – 2017. – № 2. – С. 94 – 100. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_29712550_39346902.pdf (дата обращения: 18.11.2018).
320. Киракосян, Р.Н. Содержание фенольных соединений в листьях растений-регенерантов капусты белокочанной (*brassica oleracea L.*) / Р.Н. Киракосян, Е.А. Калашникова. // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. – 2017. – № 2. – С. 34 – 43. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_29385010_47132089.pdf (дата обращения: 18.11.2018).
321. Исследование состава флавоноидов плодов облепихи крушиновидной О.В. Тринеева, И.Б. Перова, А.И. Сливкин, К.И. Эллер. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2017. – Т. 17, № 1. – С. 87 – 93. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_29044474_11099679.pdf (дата обращения: 18.11.2018).
322. Особенности накопления фенольных соединений в растениях некоторых видов рода *Rumex L.* / П.В. Федураев, Л.Н. Скрыпник, П.В. Масленников, Г.Н. Чупахина, Н.А. Таценко. – DOI: 10.14258/jcprm.201703755. // *Химия*

растительного сырья. – 2017. – № 3. – С. 123 – 130. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_29952204_41195351.pdf (дата обращения: 18.11.2018).

323. Ламан, Н.А. Разработка методик экстракции и количественного определения каротиноидов методом ВЭЖХ в плодах растений / Н.А. Ламан, Н.А. Копылова, В.М. Белякова. // Растительные ресурсы. – 2012. – Т. 48, № 3. – С. 469 – 475. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_17823121_38271615.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

324. HPLC analysis of carotenoids from tomatoes using cross-linked C18 column and MS detection / H.G. Daood, G.Bencze, G. Palotas [et al.]. – DOI:10.1093/chromsci/bmt139. // Journal of Chromatographic Science. – 2014. – Vol.52, №9. – P. 985 – 991. – URL: <https://paperity.org/p/94020555/hplc-analysis-of-carotenoids-from-tomatoes-using-cross-linked-c18-column-and-ms-detection>. – Дата публикации: 17 сентября 2013.

325. Determination of fucoxanthin isomers in microalgae (*Isochrysis* sp.) by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector multistage mass spectrometry coupled with positive electrospray ionization / P. Crupi, A.T. Toci, S. Mangini [et al.]. – DOI: <https://doi.org/10.1002/rcm.6531>. // Rapid Commun Mass Spectrom. – 2013. – №27(9). – P. 1027 – 1035. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/rcm.6531>. – Дата публикации: 15 апреля 2013.

326. Hammann, S. Isolation of β -carotene, α -carotene and lutein from carrots by countercurrent chromatography with the solvent system modifier benzotrifluoride / Englert M., S. Hammann, W. Vetter. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.020>. // Journal of Chromatography A. – 2015. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967315002459?via%3Dihub>. – Дата публикации: 15 февраля 2015.

327. Park, S.W. Isolation and analysis of bioactive compounds in capsicum peppers *Asnin L.* / S.W. Park. – DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.652316>. // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2015. – Vol.55, № 2. – P. 254 – 289. – URL:

- <http://www.biomedsearch.com/nih/Isolation-analysis-bioactive-compounds-in/24915387.html>
. – Дата публикации: 18 августа 2014.
328. Evaluation of some carotenoids in grapes by reversed- and normal-phase liquid chromatography: a qualitative analysis. / Maria Manuela Mendes-Pinto, A C Silva Ferreira; M Beatriz P P Oliveira; Paula Guedes de Pinho. – DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0499469>. // J. Agric Food Chem. – 2004. – №52(10). – P. 3182 – 3188. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf0499469>. – Дата публикации: 23 апреля 2004.
329. 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> (дата обращения: 30.30.2016).
330. Nutritional recommendations for cardiovascular disease prevention / Eilat-Adar S. Tali Sinai, Chaim Yosefy, Yaakov Henkin . – DOI: <https://doi.org/10.3390/nu5093646>. // Nutrients. – 2013. – Vol.5, №9. – P. 3646 – 3683. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3798927/>. – Дата публикации: 17 сентября 2013
331. Афанасьева, П.В. Актуальные аспекты комплексного использования календулы лекарственной / П.В. Афанасьева. // Аспирантский вестник Поволжья. – 2014. – № 5-6. – С. 152 – 154. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23062778_83982980.pdf (дата обращения: 30.30.2016).
332. Химический состав и биологическая активность сапропеля оз. Глубокое (Татарстан) / В.А. Платонов, А.А. Хадарцев, К.Я. Фридзон, С.Н. Чуносков. – DOI: [10.12737/5935](https://doi.org/10.12737/5935). // Вестник новых медицинских технологий.– 2014. – Т.21, №3. – С. 199 – 204. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_22478165_14288461.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
333. Frank, H.A. Redox functions of carotenoids in photosynthesis / H.A. Frank, G.W. Brudvig. – DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/bi0492096>. // Biochemistry. – 2004. – №27 (43). – P. 8607 – 8615. – URL: <http://www.biomedsearch.com/nih/Redox-functions-carotenoids-in-photosynthesis/15236568.html> . – Дата публикации: 3 июля 2004.

334. Турченков, С.С. Современные перспективы применения гороха посевного (*Pisum sativum* L.) в качестве лекарственного растительного сырья / С.С. Турченков, Е.Б. Хлебцова, М.Ю. Пучков. // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – №6. – С. 407 – 410. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_18993078_73890664.pdf (дата обращения: 18.11.2018)
335. Содержание антоциановых и каротиноидных пигментов в лекарственных растениях / П.В. Масленников, Чупахина Г.Н., Скрыпник Л.Н. [и др.]. // *Вестник МГОУ*. – 2013. – №1.– С. 1–14. – URL: www.evestnik-mgou.ru (дата обращения: 18.11.2018).
336. Molecular action mechanisms of solar infrared radiation and heat on human skin / M. Akhalaya, A.B. Rubin, J. Lademann [et al.]. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.03.006>. // *Ageing Research Reviews*. – 2014. – Vol.16, №1. – P. 1 – 11. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163714000439?via%3Dihub>. – Дата публикации: 15 апреля 2015.
337. Molecular mechanism of photoactivation and structural location of the cyanobacterial orange carotenoid protein / H. Zhang, H. Liu, D. M. Niedzwiedzki [et al.]. – DOI.org/10.1021/bi401539w // *J. Biochemistry*. – 2014. – Vol.53, №1. – P. 13 – 19. – URL: https://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/bi401539w/suppl_file/bi401539w_si_001.pdf. – Дата публикации: 14 января 2014.
338. The potential of seaweed as a source of drugs for use in cancer chemotherapy / C. Murphy, J.Worthington, S. Hotchkiss, S. R. McKeown . – DOI: 10.1007/s10811-014-0245-2. // *Journal of Applied Phycology*. – 2014. – Vol. 26, №5. – P. 2211 –2264. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10811-014-0245-2>. – Дата публикации: 20 февраля 2014.
339. Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health / J. Zhang, Z.Sun, P. Sun [et al.]. – DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c3fo60607d>. // *Food and Function*. – 2014. – Vol.5, №3. – P. 413 – 425. – URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/FO/c3fo60607d#!divAbstract>. – Дата публикации: 31 января 2014.

340. Giuliano, G. Plant carotenoids: genomics meets multi-gene engineering / G. Giuliano. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.006>. // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2014. – Vol.19. – P. 111 – 117. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526614000624?via%3Dihub>. – Дата публикации: 7 июня 2014.
341. Moise, A.R. Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis / A.R. Moise, S. Al-Babili, E.T. Wurtzel. – DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/cr400106y>. // *Chemical Reviews*. – 2014. – Vol.114, № 1. – С. 164 – 193. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3898671/>. – Дата публикации: 31 октября 2013.
342. Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids / R. Alvarez, Belen Vaz, Hinrich Gronemeyer, Angel R. de Lera. – DOI: 10.1021/cr400126u. // *Chemical Reviews*. – 2014. – Vol.114, №1. – С. 1 – 125. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/cr400126u>. – Дата публикации: 8 января 2014.
343. Шубенкова, Е.Г. Эмульсионные препараты для фармацевтики и ветеринарии: получение и стабилизация / Е.Г. Шубенкова. // Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства. – 2013. – Т.3, вып.6. – С. 307 – 308. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_20350770_19901101.pdf (дата обращения: 18.11.2018).
344. Структуры ядро–оболочка и полиэлектролитные капсулы с иммобилизованными кислотнo-основными индикаторами / Н. А. Бурмистрова, Т.Ю. Колонтаева, Т.Ю. Русанова, [и др.]. // *Известия Саратовского ун-та. Новая серия. Сер. Химия. Биология. Экология*. – 2013. – Т.13, вып. 4. – С. 5 – 12. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_21135253_76208779.pdf (дата обращения: 18.11.2018).
345. Кролевец, А.А. Применение нано- и микрокапсулирования в фармацевтике и пищевой промышленности. Часть 2. характеристика инкапсулирования / А.А. Кролевец, Ю.А. Тырсин, Е.Е. Быковская. // *Вестник Российской академии естественных наук*. – 2013. – № 11. – С. 77 – 84. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_19131698_67142312.pdf (дата обращения: 18.11.2018).

346. Романова, О.Л. Виды лекарственных форм с продлённым действием / О.Л. Романова. // Земский врач. – 2010. – № 2. – С. 25 – 26. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_15632752_75149972.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
347. Комплексная коацервация овальбумина и хитозана в водном растворе / Т. А. Мрачковская Н.А. Феоктистова, И.Г. Плащина, Г.Е. Заиков. // Вестник Казанского технологического университета . – 2015. – Т.18, № 2. – С. 124 – 130. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23006508_49547707.pdf (дата обращения: 18.11.2018).
348. Меньшутина, Н.В. Технологии инкапсуляции / Н.В. Меньшутина. // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2014. – № 3. – С. 44 – 47. – URL: http://www.medbusiness.ru/upload/img/FTU_3_2014-44-47.pdf (дата обращения: 18.11.2018).
349. Guanghai, Ma Microspheres and microcapsules in biotechnology: Design, preparation and applications / Guanghai Ma, Zhiguo Su. – New York.: Broken Taylor & Francis Group, 2013. – 539 с. – URL: https://play.google.com/store/books/details/Microspheres_and_Microcapsules_in_Biotechnology_De?id=F63SBQAAQBAJ&hl=ru (дата обращения:18.11.2018).
350. Simon, Benita Microencapsulation Methods and Industrial Applications / Simon, Benita. – New York, London: Taylor & Francis Group, 2006. – 783 с. . –URL: <http://bookre.org/reader?file=1294915> (дата обращения: 03.03.2016).
351. Дышлюк, Л.С. Характеристика буферных свойств гидроколлоидов растительного происхождения как компонентов полимерных пленок / Л.С. Дышлюк, Л.А. Астахова, О.О. Бабич. // Science Time. – 2014. – №8. – С. 99 – 102. – URL: <https://vivliophica.com/articles/food/462204> (дата обращения: 18.11.2018).
352. Microencapsulation – a novel approach in drug delivery: a review / Nitika Agnihotri Ravinesh Mishra, Chirag Goda, Manu Arora. // Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2012. – № 2(1). – P. 1 – 20. – URL: <https://www.iglobaljournal.com/wp-content/uploads/2012/05/1.-Nitika-Agnihotri-et-al-2012.pdf> (дата обращения: 03.03.2016).

353. Patil, B.S., Preparation and evaluation of flutamide mucoadhesive microparticles loaded poloxamer suppositories / B.S. Patil, H.S. Mahajan, S.J. Surana . – DOI: <https://doi.org/10.1007/s40005-015-0217-9>. // Journal of Pharmaceutical Investigation. – 2016. – Vol. 46. – P. 139 – 146. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40005-015-0217-9#citeas>. – Дата публикации: 15 октября 2015.
354. Microencapsulation: a review of applications in the food and pharmaceutical industries / Methavee Peanparkdee, Satoshi Iwamoto, Ryo Yamauchi. – DOI: 10.7831/ras.4.56. // Reviews in Agricultural Science. – 2016. – Vol. 4. – P. 56 – 65. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/311158235>. – Дата публикации: 30 ноября 2016.
355. Research advances of microencapsulation and its prospects in the petroleum industry / Miaomiao Hu, Jintang Guo, Yongjin Yu [et al.]. – DOI: 10.3390/ma10040369. // Materials. – 2017. – №10. – P. 369. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/315925643>. – Дата публикации: 31 марта 2017.
356. Патент №2538719 МПК А61К9/00, А61К35/12, А61К9/52, А61К9/50, В01J13/06. Способ получения частиц микрокапсулированного антисептика-стимулятора Дорогова (АСД) 2 фракция в альгинате натрия : №2013157684/15 : заявл. 24.12.2013 : опубл. 10.01.2015 / Кролевец А.А., Сеин О.Б., Богачев И.А.– URL: <https://patentdb.ru/patent/2538719> (дата обращения: 03.03.2016).
357. Корочинский, А.В. Технологическая разработка иммобилизованных лекарственных форм с биоспорином и их исследования : специальность 14.04.01 «Технология получения лекарств» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук: / Корочинский Алексей Викторович ; Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолГМУ Минздрава России. – Пятигорск, 2014. – 23 с. : ил.
358. Разработка и анализ микрокапсул с ликопином / С.В. Печинский, А.Г. Курегян, О.В. Авдеева, Т.Ф. Маринина. // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. тр. – Пятигорск: Пятигорский

медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ МЗ РФ, 2013. – Вып. 68. – С. 192 – 193.

359. Демина, П.А. Полиэлектролитные микрокапсулы, модифицированные наноразмерным диоксидом титана, для адресной доставки лекарственных средств / П.А. Демина, Е.В. Дегтярева, Г.М. Кузьмичева. // Вестник МИТХТ. – 2014. – Т.9, №4. – С. 73 – 79. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_22978480_45865914.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

360. Полковникова, Ю.А. Биофармацевтические исследования спансул афобазола *in vitro* / Ю.А. Полковникова, Э. Ф. Степанова, И.Я. Куль. // Научные ведомости БелГУ Серия Медицина. Фармация. – 2010. – №10(81). – С. 89 – 92. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_15238658_52454965.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

361. Полковникова, Ю.А. Комплексные исследования по выбору оптимальных условий микрокапсулирования лекарственной субстанции нейротропного действия / Ю.А. Полковникова. // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С.554. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23940396_82458627.pdf (дата обращения:03.03.2016.).

362. Полковникова, Ю.А. Оптимизация состава и размера микрокапсул афобазола / Ю. А. Полковникова, Д. А. Кустова. // Современная фармация: проблемы и перспективы развития: материалы V межрегиональной научно-практической конференции с международным участием ГБОУ ВПО СОГМА Минздрава России, – Владикавказ.: Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова, 2015. – С. 226 – 228. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_25371399_77638375.pdf (дата обращения: 03.03.2016).

363. О Руководстве по валидации процесса производства лекарственных препаратов для медицинского применения. – Москва, 2017. – 27 с. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/456095627> (дата обращения: 03.03.2016).

364. Кошелев, Ю.А. Облепиха: монография. / Ю.А. Кошелев, Л.Д. Агеева. - Бийск: НИЦ БПГУ им. В.М. Шукшина., 2004. – 320 с. : ил. – ISBN 5-85127-320-8.

365. Li, Thomas S.C. Beveridge Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): Production and Utilization / Thomas S.C. Li, H.J. Thomas, Ottawa. // NRC Research Press, 2003. – 133 с. – URL: <http://bookre.org/reader?file=705244> (дата обращения: 17.07.2010).
366. Сравнительный анализ композиций облепихового и подсолнечного масел / А.Л. Верещагин, Н.В. Горемыкина, Н.В. Бычин, Ю.А. Кошелев. // Техника и технология пищевых производств. – 2013. – №2. – С. 116 – 120. – URL: <https://docslide.net/documents/-5750a9ca1a28abcf0cd2f201.html> (дата обращения: 18.11.2018).
367. Михеев, А.М. Облепиха. / А.М. Михеев, В.И. Деменко. М.: Росагропром – издат, 1990. – 48 с. – ISBN 5-260-02610-1.
368. Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения [фармакопейная статья]. – Р №000245/02-260312. – Бийск: Алтайвитамины, 2012. – 12 с.
369. Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения [фармакопейная статья]. – ЛП 002408-210314. – Серпухов: ВИФИТЕХ, 2014. – 16 с.
370. Чечета, О.В. Идентификация растительных масел и масляных экстрактов методом ТСХ / О.В. Чечета, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – №4. – С. 646 – 653. – URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_11928790_45286385.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
371. 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. – С. 505.– URL: <http://www.science-education.ru/129-23071> (дата обращения: 18.11.2018).
372. Современный энциклопедический словарь. – Москва, 2017. – URL: <http://encyclopediadic> (дата обращения: 03.03.2016).

373. Новиков, А.М. Методология научного исследования / А.М. Новиков, Д.А. Новиков. – М.: Либроком. – 2010. – 280 с. – URL: <https://studfiles.net/preview/5580694/> (дата обращения: 03.03.2016).
374. Новиков, Д.А. Методология управления / Д.А. Новиков. – М.: Либроком, – 2011. – 128 с. – URL: http://www.methodolog.ru/books/metod_upr.pdf (дата обращения: 03.03.2016).
375. Российская Федерация. Законы. Об обращении лекарственных средств : Федеральный закон № 61-ФЗ [принят Государственной Думой 24 марта 2010 года : одобрен Советом Федерации 31 марта 2010 года]. – URL: <http://www.consultant.ru> (дата обращения:03.03.2016).
376. Об утверждении правил надлежащей производственной практики : Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 (ред. от 18.12.2015) [Зарегистрировано в Минюсте России 10 сентября 2013 г. N 29938]. – URL: <http://pharmacta.ru> (дата обращения: 18.11.2018).







«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ЗАО «ВИФИТЕХ»

(Р42279 Московская обл., Серпуховский район,

п. Облепихов, ГНИИМБ, корп. 84)

С.А. Постельников

2018 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационного исследования доцента кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, кандидата фармацевтических наук Курегян Анны Гургеновны на фармацевтическом предприятии ЗАО «ВИФИТЕХ»

ЗАО «ВИФИТЕХ» при разработке НД на лекарственные препараты, содержащие каротиноиды, при их промышленном производстве, а также при входном контроле сырьевых материалов действительно использует материалы диссертационного исследования Курегян Анны Гургеновны, посвященного теоретическому и экспериментальному обоснованию получения индивидуальных каротиноидов и созданию на их основе лекарственных средств.

Предложенные доцентом Курегян А.Г. методики качественного анализа каротиноидного состава облепихового масла (метод спектрофотометрии), а также методики количественного определения содержания суммы каротиноидов (метод спектрофотометрии) апробированы в процессе работы предприятия.

Внедренные результаты исследований Курегян А.Г. способствуют повышению объективности оценки качества лекарственного препарата «Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения».

Методика определения содержания каротиноидов методом спектрофотометрии в облепиховом масле включена в НД – № ЛП 002408-210314 «Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения» предприятия ЗАО «ВИФИТЕХ».

Методики идентификации каротиноидов методом спектрофотометрии могут быть включены в проект Изменений к ФСП ЗАО «ВИФИТЕХ» «Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения» (НД – № ЛП 002408-210314), в раздел «Подлинность».

Начальник лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ»,
доктор фармацевтических наук,
профессор РАН

И.Н. Зилфикаров



**МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минздрав России)
ЗАМЕСТИТЕЛЬ МИНИСТРА**

Рахмановский пер., 3, Москва, ГСП-4, 127994
тел.: (495) 628-44-53, факс: (495) 628-50-58

21.03.2014 № 20-2-437774/П/РЛП

На № _____ от _____

**Решение о государственной
регистрации лекарственного
препарата для медицинского
применения**



Министерством здравоохранения Российской Федерации в соответствии со статьей 27 Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и на основании представленного заявления о государственной регистрации лекарственного препарата и регистрационного досье (вх. № 437774 от 31.07.2013), по результатам проведенных экспертиз принято решение о государственной регистрации лекарственного препарата для медицинского применения:

Облепиховое масло

(торговое наименование лекарственного средства)

~

(международное непатентованное или группировочное (химическое) наименование лекарственного средства)

масло для приема внутрь, местного и наружного применения

(лекарственная форма, дозировка)

**Закрытое акционерное общество "ВИФИТЕХ"
(ЗАО "ВИФИТЕХ"), Россия
142279, Московская обл., Серпуховский район,
пос. Оболенск, ГНЦ ПМ**

(наименование и адрес места осуществления производства)

2

и включении его в государственный реестр лекарственных средств для медицинского применения.

Приложение: копия заключения комиссии экспертов, представленного письмом от 18.03.2014 № 3109, на 15 л. в 1 экз.



 МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ Регистрационное удостоверение лекарственного препарата для медицинского применения ЛП-002408 (номер регистрационного удостоверения лекарственного препарата)	
Наименование держателя (владельца) регистрационного удостоверения лекарственного препарата	Закрытое акционерное общество "ВИФИТЕХ" (ЗАО "ВИФИТЕХ"), Россия
Адрес местонахождения держателя (владельца) регистрационного удостоверения лекарственного препарата	142279, Московская обл., Серпуховский район, пос. Оболенск, ГНЦ ПМ
Дата государственной регистрации лекарственного препарата	21.03.2014
Срок действия регистрационного удостоверения лекарственного препарата	со сроком действия 5 лет
Дата внесения изменений в регистрационное удостоверение лекарственного препарата (дата замены регистрационного удостоверения лекарственного препарата)	19.07.2017
Информация о зарегистрированном лекарственном препарате:	
Торговое наименование	Облепиховое масло
Международное непатентованное, или группировочное, или химическое наименование	Облепихи масло
Лекарственная форма	масло для приема внутрь, местного и наружного применения
Дозировка	-
Качественный состав и количественный состав действующих веществ и качественный состав вспомогательных веществ	
облепихи плодов масло	
Форма выпуска (лекарственная форма, дозировка, первичная упаковка, количество лекарственной формы в первичной упаковке, количество первичной упаковки в потребительской упаковке, комплектность)	масло для приема внутрь, местного и наружного применения (флакон) 30/50/100 мл x 1 (пачка картонная)
Реквизиты нормативной документации	ЛП 002408-210314

016436

Страница 2 регистрационного удостоверения № ЛП-002408

Производственные площадки, участвующие в процессе производства лекарственного препарата, с указанием стадий производства, названий и фактических адресов местонахождения

Производитель (Все стадии производства)

Закрытое акционерное общество
"ВИФИТЕХ" (ЗАО "ВИФИТЕХ"), Россия

Московская обл., Серпуховский район, пос. Оболенск, корп. 84, корп. 87, зд. 90

Заместитель Министра



С.А. Краевой

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ЛП 002408 - 210314

Регистрационное удостоверение №

СОГЛАСОВАНО

Дата регистрации « _____ » _____ 20__ г.

ЗАО «ВИФИТЕХ», 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, ГНЦ ПМ
наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное удостоверение, адрес

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

_____ номер

Облепиховое масло

_____ торговое наименование лекарственного препарата

_____ международное непатентованное или химическое наименование

**масло для приема внутрь,
местного и наружного применения**

_____ лекарственная форма, дозировка

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия

УПАКОВЩИК [ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА]

ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия

8 1 8 4 4

СПЕЦИФИКАЦИЯ**Облепиховое масло****масло для приема внутрь, местного и наружного применения****ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия**

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
1	2	3
Описание	Органолептический	Маслянистая жидкость оранжево-красного цвета с характерным запахом. Допускается наличие незначительного осадка, растворяющегося при нагревании до 40 °С
Растворимость	ГФ XII	Практически нерастворимо в воде, легко растворимо в хлороформе и метиленхлориде
Подлинность	ГЖХ	На хроматограмме испытуемого раствора должны наблюдаться пики, принадлежащие метиловым эфирам жирных кислот, в следующей последовательности: 1 – метиловый эфир миристиновой кислоты; 2 – метиловый эфир пальмитиновой кислоты; 3 – метиловый эфир пальмитолеиновой кислоты; 4 – метиловый эфир стеариновой кислоты; 5 – метиловый эфир олеиновой кислоты; 6 – метиловый эфир линолевой кислоты; 7 – метиловый эфир линоленовой кислоты
	Спектрофотометрический	Спектр поглощения испытуемого раствора в области от 420 до 500 нм должен иметь максимумы поглощения при длинах волн (447 ± 5) нм и (470 ± 5) нм
Плотность	ГФ XII Метод 3	От 0,91 до 0,93 г/см ³
Показатель преломления	ГФ XII	От 1,468 до 1,476
Кислотное число	ГФ XI	Не более 7,5
Йодное число	Титриметрический	Не менее 30
Число омыления	ГФ XI	От 120 до 200
Перекисное число	Титриметрический	Не более 15 ммоль (½ O)/кг
Летучие вещества	ГФ XI	Не более 0,15 %
Остаточные органические растворители – метиленхлорид	ГХ	Не более 0,06 %

1	2	3
Объем содержимого упаковки	ОСТ 64-492-85	В соответствии с требованиями
Микробиологическая чистота	ГФ XII	Категория 2
Количественное определение – содержание суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин	Спектрофотометрический	Не менее 0,18 %
Упаковка		По 50 или 100 мл во флаконы оранжевого стекла, укупоренные пробками и крышками навинчиваемыми По 100 мл во флаконы оранжевого стекла, укупоренные колпачками алюминиевыми с перфорацией с прокладками полимерными По 100 мл во флаконы из полиэтилентерефталата коричневого цвета с колпачками системы контроля первого вскрытия Каждый флакон вместе с инструкцией по применению помещают в пачку из картона
Маркировка		В соответствии с ФСП
Хранение		В защищенном от света месте при температуре от 8 до 15 °С
Срок годности		2 года

Настоящая фармакопейная статья предприятия распространяется на **Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения**, получаемое из отжатых и высушенных плодов культивируемого или дикорастущего кустарника или небольшого дерева облепихи крушиновидной – *Hippophae rhamnoides* L., семейство лоховые – *Elaeagnaceae* экстракцией метилхлоридом при соотношении сырья и конечного продукта – (4-8) : 1.

Описание. Маслянистая жидкость оранжево-красного цвета с характерным запахом. Допускается наличие незначительного осадка, растворяющегося при нагревании до 40 °С.

Растворимость. Практически нерастворимо в воде, легко растворимо в хлороформе и метилхлориде (ГФ XII, ч. 1, с. 92).

Подлинность. 0,05 мл препарата помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 1 мл метанола, 3 капли ацетилхлорида и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 1 ч. Затем холодильник отсоединяют, избыток метанола отгоняют нагреванием колбы на водяной бане. В охлажденную реакционную смесь прибавляют 0,4 мл гексана и перемешивают. Полученную смесь переносят в виалу или пробирку со шлифом и укупоривают (испытуемый раствор).

1,0 мкл испытуемого раствора, отобранного микрошприцем, анализируют на газовом хроматографе с программным управлением в следующих условиях:

- детектор пламенно-ионизационный;
- колонка капиллярная марки Swax 20 M длиной 30 м с внутренним диаметром 0,53 мм и толщиной неподвижной фазы 1 мкм или аналогичная;
- температура колонки – 180 °С;
- температура детектора – 210 °С;
- температура инжектора – 240 °С;

- газ-носитель – гелий;
- расход газа-носителя – 30 мл/мин;
- деление потока – 1 : 6;
- расход водорода – 30 мл/мин;
- расход воздуха – 300 мл/мин.

На хроматограмме испытуемого раствора должны наблюдаться пики, принадлежащие метиловым эфирам жирных кислот, в следующей последовательности: 1 – метиловый эфир миристиновой кислоты; 2 – метиловый эфир пальмитиновой кислоты; 3 – метиловый эфир пальмитолеиновой кислоты; 4 – метиловый эфир стеариновой кислоты; 5 – метиловый эфир олеиновой кислоты; 6 – метиловый эфир линолевой кислоты; 7 – метиловый эфир линоленовой кислоты (рисунок 1).

Спектр поглощения испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение») в области от 420 до 500 нм должен иметь максимумы поглощения при длинах волн (447 ± 5) нм и (470 ± 5) нм.

Плотность. От 0,91 до 0,93 г/см³ (ГФ XII, ч. 1, с. 38, метод 3).

Показатель преломления. От 1,468 до 1,476 (ГФ XII, ч. 1, с. 52).

Кислотное число. Около 1 г (точная навеска) препарата помещают в стакан вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл спирта 96 %, нейтрализованного до рН 9,9, перемешивают с помощью магнитной мешалки в течение 1 мин и титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до рН 9,9 (потенциометрически).

Кислотное число должно быть не более 7,5 (ГФ XI, вып. 1, с. 191).

Примечание. Приготовление спирта 96 %, нейтрализованного до рН 9,9. 160 мл спирта 96 % помещают в стакан вместимостью 200 мл, прибавляют 0,1 М раствор натрия гидроксида до достижения рН раствора от 9,85 до 9,95 (потенциометрически).
Срок годности раствора – 3 мес.

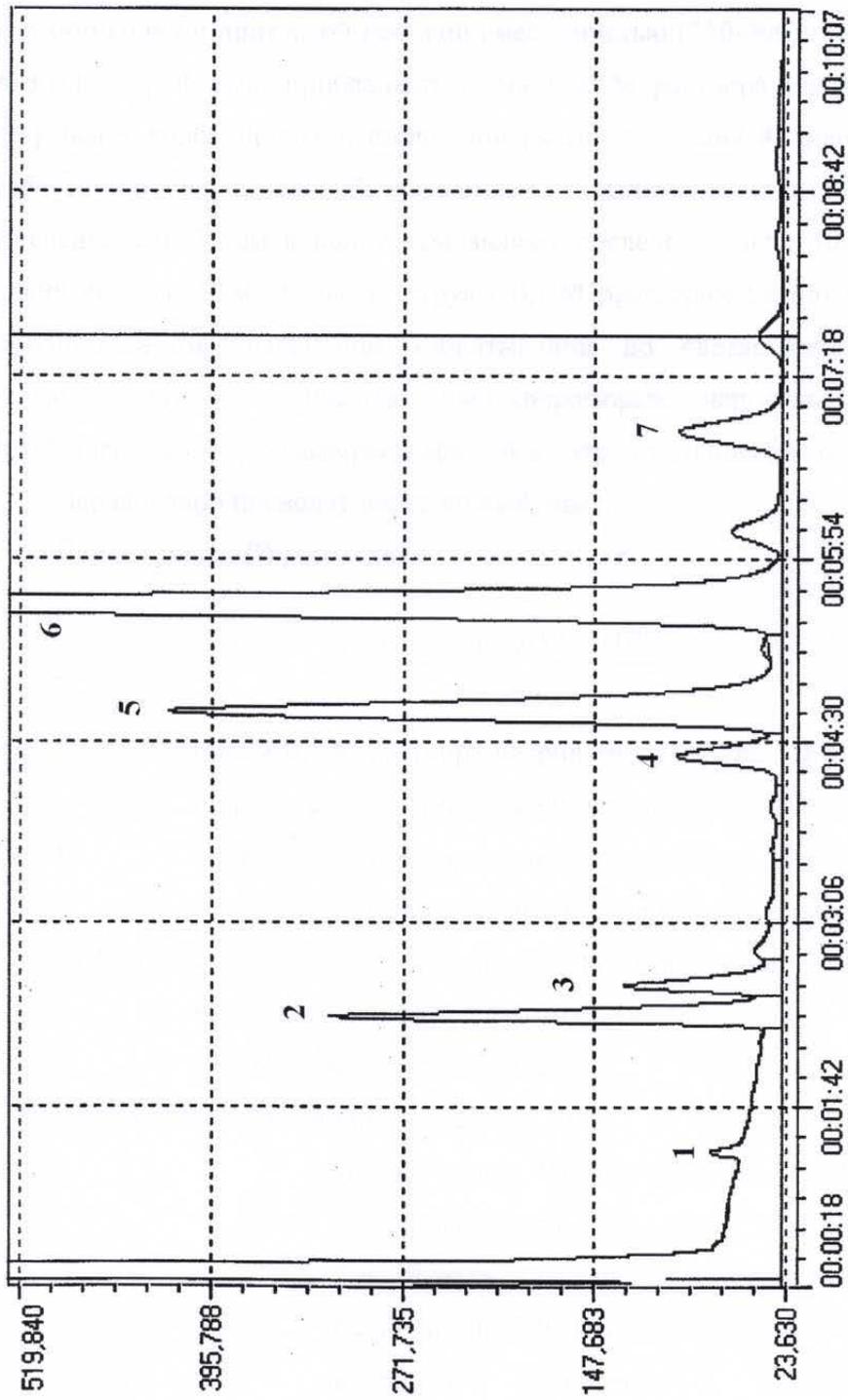


Рисунок 1. Газожидкостная хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот лекарственного препарата «Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения»

Йодное число. Около 0,5 г (точная навеска) препарата помещают в сухую колбу с притертой пробкой вместимостью (250-300) мл, растворяют в 3 мл хлороформа, прибавляют 20 мл 0,05 М раствора йодмоноклорида, закрывают колбу пробкой, смоченной раствором калия йодида, осторожно взбалтывают вращательным движением и выдерживают в темном месте в течение 1 ч. Затем в колбу прибавляют последовательно 10 мл раствора калия йодида, 50 мл воды и титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата при постоянном энергичном взбалтывании до светло-желтой окраски, после чего туда же прибавляют 3 мл хлороформа, энергично взбалтывают, прибавляют 1 мл крахмала раствора 1 % и титруют до обесцвечивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Йодное число (I) рассчитывают по формуле:

$$I = \frac{(V_0 - V) \cdot 0,01269 \cdot 100}{a},$$

где V_0 – объем 0,1 М раствора натрия тиосульфата, израсходованного на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах;

V – объем 0,1 М раствора натрия тиосульфата, израсходованного на титрование испытуемого раствора, в миллилитрах;

0,01269 – количество йода, соответствующее 1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата, в граммах;

a – навеска препарата в граммах.

Йодное число должно быть не менее 30.

Примечание. Приготовление 0,05 М раствора йодмоноклорида. 5,53 г калия йодида и 3,55 г калия йодата помещают в колбу с притертой пробкой, прибавляют 50 мл воды, 40 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и взбалтывают до полного растворения йода,

образующегося при реакции. Затем в ту же колбу прибавляют 10 мл хлороформа, после чего смесь переносят в делительную воронку и снова взбалтывают. Если хлороформный слой окрашивается в фиолетовый цвет, прибавляют по каплям при сильном взбалтывании калия йодата раствор 1 % до обесцвечивания хлороформного слоя. Если же хлороформный слой остается бесцветным, прибавляют по каплям калия йодида раствор 1 % до появления слабо-розовой окраски. После отстаивания водный слой сливают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки. Раствор должен иметь лимонно-желтый цвет.

1 мл раствора содержит 0,008118 г йодмоноклорида.
Установка титра. 25 мл приготовленного раствора йодмоноклорида помещают в колбу с притертой пробкой, прибавляют 1 г калия йодида и оставляют в защищенном от света месте на 15 мин. Выделившийся йод титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата (индикатор – крахмала раствор 1 %). Молярность раствора M_1 (моль/л) устанавливают по формуле:

$$M_1 = \frac{0,1 \cdot V_0}{2 \cdot 25},$$

где V_0 – объем 0,1 М раствора натрия тиосульфата, израсходованного на титрование, в миллилитрах.

Поправочный коэффициент (К) рассчитывают как отношение реально полученной концентрации раствора йодмоноклорида к теоретически заданной. Коэффициент К должен находиться в пределах от 0,98 до 1,02.

Титр раствора устанавливают каждый раз перед применением.

Раствор хранят в сосудах темного стекла с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Число омыления. От 120 до 200 (ГФ XI, вып. 1, с. 192).

Перекисное число. Определяют титриметрическим методом по реакции перекисей и гидроперекисей с калия йодидом с образованием йода, количество которого, выраженное в миллимолях на килограмм (ммоль/кг) пробы, эквивалентно количеству ($\frac{1}{2} O$).

Около 2 г (точная навеска) препарата помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл, приливают 15 мл уксусной кислоты безводной и 1 мл калия йодистого раствора 50 %. Колбу сразу же закрывают пробкой, перемешивают в течение 1 мин и оставляют на 5 мин в темном месте при температуре (15-25) °С. Затем в колбу прибавляют 75 мл воды, перемешивают и добавляют пять капель крахмала раствора 1 %. Выделившийся йод титруют 0,01 М раствором натрия тиосульфата. Для каждой испытуемой пробы выполняют два измерения.

Параллельно проводят контрольный опыт.

За результат измерения принимают среднее арифметическое значение двух параллельных измерений.

Перекисное число (X) в ммоль ($\frac{1}{2} O$)/кг рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(V - V_0) \cdot 0,01 \cdot 1000 \cdot 1000}{a \cdot 1000} = \frac{(V - V_0) \cdot 10}{a},$$

где V – объем 0,01 М натрия тиосульфата, израсходованного на титрование испытуемого раствора, в миллилитрах;

V_0 – объем 0,01 М натрия тиосульфата, израсходованного на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах;

0,01 – концентрация раствора натрия тиосульфата, моль/л;

a – навеска препарата в граммах.

Перекисное число должно быть не более 15 ммоль ($\frac{1}{2} O$)/кг.

Примечания. 1. Приготовление 0,01 М раствора натрия тиосульфата. Готовят разведением 0,1 М раствора натрия тиосульфата в 10 раз.

Раствор используют свежеприготовленным.

2. На титрование в контрольном опыте должно пойти не более 0,1 мл 0,01 М раствора натрия тиосульфата.

3. Приготовление калия йодида раствора 50 %.

12,5 г калия йодида помещают в стакан, прибавляют 12 мл воды и перемешивают до полного растворения. Полученный раствор количественно с помощью воды переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, затем доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Летучие вещества. Около 5 г (точная навеска) препарата помещают в бюкс и нагревают в сушильном шкафу при температуре (100-105) °С в течение 1 ч. Содержание летучих веществ должно быть не более 0,15 % (ГФ XI, вып. 1, с. 176).

Остаточные органические растворители. Остаточное количество метиленхлорида в препарате определяют методом газовой хроматографии (ГХ) в условиях Head-Space с термостатированием при 85 °С в течение 30 мин.

Около 0,5 г (точная навеска) препарата помещают во флакон Head-Space вместимостью 20 мл, прибавляют 2 мл раствора внутреннего стандарта, затем герметично укупоривают и перемешивают в режиме вибрации (испытываемый раствор).

По 1,0 мл паровоздушной фазы, отобранной дозатором равновесного пара от испытываемого раствора и стандартного раствора Б, последовательно хроматографируют на газовом хроматографе с программным управлением и обработкой данных, получая для каждого раствора не менее 3 хроматограмм в следующих условиях:

- детектор пламенно-ионизационный;
- колонка капиллярная с фазой OV-624 длиной 30 м с внутренним диаметром 0,53 мм и толщиной неподвижной фазы 3 мкм или аналогичная при условии соблюдения требований теста «Проверка пригодности хроматографической системы»;
- температура колонки – 45 °С;
- температура детектора – 150 °С;
- температура инжектора – 200 °С;
- газ-носитель – гелий;
- расход газа-носителя – 20 мл/мин;
- деление потока – 1 : 5;
- расход водорода – 40 мл/мин;
- расход воздуха – 400 мл/мин.

Идентификацию метиленхлорида осуществляют путем сравнения времени удерживания пика на хроматограмме испытываемого раствора и пика метиленхлорида на хроматограмме стандартного раствора Б.

Содержание остаточного растворителя – метиленхлорида (X) в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \cdot S_0^{BC} \cdot a_0 \cdot P \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100}{S_0 \cdot S^{BC} \cdot a \cdot 100 \cdot 100 \cdot 50} = \frac{S \cdot S_0^{BC} \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot S^{BC} \cdot a \cdot 200},$$

- где S – среднее арифметическое значение площадей пиков метиленахлорида на хроматограммах испытуемого раствора;
- S_0 – среднее арифметическое значение площадей пиков метиленахлорида на хроматограммах стандартного раствора Б;
- S^{BC} – среднее арифметическое значение площадей пиков пропанола-2 на хроматограммах испытуемого раствора;
- S_0^{BC} – среднее арифметическое значение площадей пиков пропанола-2 на хроматограммах стандартного раствора Б;
- a – навеска препарата в граммах;
- a_0 – навеска метиленахлорида, взятая для приготовления стандартного раствора, в граммах;
- P – содержание основного вещества в метиленахлориде в процентах.
- Содержание метиленахлорида в препарате не должно превышать 0,06 % (ГФ XII, ч. 1, с. 115).

Примечания. 1. Приготовление раствора внутреннего стандарта. Около 0,1 г (точная навеска) пропанола-2 растворяют в 10 мл смеси диметилсульфоксид – вода (7 : 3). Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора той же смесью до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

2. Приготовление стандартного раствора. Около 0,1 г (точная навеска) метиленахлорида растворяют в 10 мл раствора внутреннего стандарта. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствором внутреннего стандарта до метки и перемешивают (раствор А).

25,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствором внутреннего стандарта до метки и перемешивают (раствор Б).

1,0 мл раствора Б переносят во флакон Head-Space вместимостью 20 мл, прибавляют 1 мл раствора внутреннего стандарта, герметично укупоривают и перемешивают.

Растворы используют свежеприготовленными.

3. Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам на хроматограмме стандартного раствора Б должна быть не менее 1000 теоретических тарелок (ГФ XI, вып. 1, с. 109);
- коэффициент разрешения между пиками, соответствующими пропанолу-2 и метиленхлориду, должен быть не менее 2;
- относительное стандартное отклонение площадей пика метиленхлорида для 5 повторных введений стандартного раствора не должно превышать 10 %.

Объем содержимого упаковки. Препарат должен выдерживать требования ОСТ 64-492-85 «Средства лекарственные. Допустимые отклонения на промышленное фасование».

Микробиологическая чистота. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ XII, ч. 1, с. 160 (категория 2).

Количественное определение. Около 0,05 г (точная навеска) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют

30 мл петролейного эфира (4), перемешивают до растворения, затем доводят объем раствора тем же эфиром до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют петролейный эфир (4).

Содержание суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин (X) в препарате в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 100}{2400 \cdot 100 \cdot a} = \frac{A \cdot 50}{a \cdot 2400};$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

a – навеска препарата в граммах;

2400 – удельный показатель поглощения ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) раствора β -каротина в петролейном эфире (4) в условиях анализа.

Содержание суммы каротиноидов в препарате в пересчете на β -каротин должно быть не менее 0,18 %.

Упаковка. По 50 или 100 мл во флаконы оранжевого стекла по ОСТ 64-2-71-80 и ОСТ 64-2-82-85, или по ТУ 9461-002-05766126-2011, или по ТУ 9461-002-14552200-2008, закупоренные пробками и крышками навинчиваемыми по ОСТ 64-2-87-81 или по ТУ 9398-001-52890925-2007.

По 100 мл во флаконы оранжевого стекла по ТУ 9461-004-05766126-2011 или по ТУ 9461-004-00480164-2001, закупоренные колпачками алюминиевыми с перфорацией с прокладками полимерными по ГОСТ Р 51214-98.

По 100 мл во флаконы из полиэтилентерефталата коричневого цвета с колпачками системы контроля первого вскрытия по ТУ 9464-007-95202676-2011.

На флаконы наклеивают этикетки из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 или бумаги писчей по ГОСТ 18510-87 или этикетки самоклеящиеся.

Каждый флакон вместе с инструкцией по применению помещают в пачку из картона для потребительской тары подгруппы хромовый или хром-эрзац по ГОСТ 7933-89.

Групповая упаковка в соответствии с ГОСТ 17768-90.

Маркировка. На этикетке флакона указывают предприятие-изготовитель, его адрес, тел./факс и товарный знак, торговое название препарата, лекарственную форму, количество препарата в миллилитрах, условия хранения, «Перед употреблением взбалтывать», номер серии, срок годности.

На пачке и этикетке групповой упаковки указывают предприятие-изготовитель, его адрес, тел./факс и товарный знак, торговое название препарата, лекарственную форму, количество препарата в миллилитрах, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности, штриховой код.

На пачке дополнительно указывают «Перед употреблением взбалтывать», «Хранить в недоступном для детей месте», условия отпуска, фармакотерапевтическую группу.

На этикетке групповой упаковки дополнительно указывают количество пачек.

Транспортирование. В соответствии с требованиями ГОСТ 17768-90.

Хранение. В защищенном от света месте при температуре от 8 до 15 °С.

Срок годности 2 года.

Примечание. Реактивы, титрованные растворы и индикаторы, приведенные в настоящей фармакопейной статье предприятия, описаны в соответствующих разделах ГФ XII, ч. 1.

Генеральный директор

ЗАО «ВИФИТЕХ»



С.А. Постельников
ФИО

81644

МИНЗДРАВ РОССИИ
ЛП 004408 - 410414
СОГЛАСОВАНО

Прошито, пронумеровано и скреплено
печатью 15 листа(ов)

Генеральный директор
ЗАО «ВИФИТЕХ»
С. А. Постельников

« 14 » сентября 2014 г.



**Обоснование спецификации на лекарственный препарат
«Облепиховое масло, масло для приема внутрь,
местного и наружного применения»
производства ЗАО «ВИФИТЕХ»**

Настоящий проект фармакопейной статьи предприятия «Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения» [1] разработан ЗАО «ВИФИТЕХ» на основе ФС 42-1730-95 «Масло облепиховое» [2] в связи с регистрацией препарата на предприятие-производитель.

Препарат зарегистрирован в РФ свыше 40 лет назад (Р № 71/273/10 от 05.04.1972) и разрешен к применению в качестве репарации тканей стимулятора растительного происхождения [3].

«Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения» (далее – Облепиховое масло) получают из отжатых и высушенных плодов культивируемого или дикорастущего кустарника или небольшого дерева облепихи крушиновидной – *Hipporhae rhamnoides L.*, семейство лоховые – *Elaeagnaceae*, экстракцией метиленхлоридом при соотношении сырья и конечного продукта – (4-8):1 и применяют в качестве лекарственного средства.

Для получения отжатых и высушенных плодов используют как свежие, так и замороженные плоды облепихи.

Облепиха крушиновидная – колючий кустарник или небольшое дерево высотой 1,5-6 м. Кора старых ветвей и стволов буро-зеленая, желто-бурая, темно-бурая, иногда почти черная. Молодые побеги серебристые, покрыты чешуевидными и звездчатыми волосками. Листья простые, очередные, сближенные, короткочерешковые, линейные или линейно-ланцетовидные, цельнокрайние, длиной до 9 см, шириной до 1 см, без прилистников, со слабо завернутыми внутрь краями, сверху серовато-темно-зеленые, снизу слегка желтовато- или буровато-серебристые. Растение двудомное: мужские

Генеральный директор
ЗАО «ВИФИТЕХ»



С. А. Постельников

Начальник лаборатории ОКК
доктор фармацевтических наук

И.Н. Зилфикаров

Начальник отдела регистрации
ЗАО «ВИФИТЕХ»
кандидат технических наук

О.К. Антонова

Начальник отдела
стандартизации
ЗАО «ВИФИТЕХ»

С.Н. Бумагина

Старший преподаватель кафедры
фармацевтической химии
Пятигорского филиала
ГБОУ ВПО «ВолгГМУ» МЗ РФ,
кандидат фармацевтических наук

А.Г. Курегян

Преподаватель кафедры
фармацевтической химии
Пятигорского филиала
ГБОУ ВПО «ВолгГМУ» МЗ РФ,
кандидат фармацевтических наук

С.В. Печинский



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ЗАО «ВИФИТЕХ»
(142279 Московская обл., Серпуховский район,
п. Оболенск, ГНЦ ПМБ, корп. 84)

С.А. Постельников

» *Постельников* 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: методика обнаружения каротиноидов методом ТСХ в лекарственном препарате «Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения».

Автор (разработчик): Курегян А. Г., кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ.

Источник информации: материалы докторской диссертации А. Г. Курегян «Теоретическое и экспериментальное обоснование получения индивидуальных каротиноидов и создание на их основе лекарственных средств».

Где внедрено: 142279 Московская обл., Серпуховский район, п. Оболенск, ГНЦ ПМБ, к. 84, фармацевтическое предприятие ЗАО «ВИФИТЕХ».

Цель внедрения: плановый пересмотр существующих фармакопейных статей и обновление нормативной документации предприятия с целью введения дополнительных показателей качества лекарственных препаратов, способствующих улучшению качества продукции.

Ответственный за внедрение: начальник лаборатории ОКК, доктор фармацевтических наук, профессор РАН И. Н. Зилфикаров.

Эффективность и значимость внедрения: уточнения и дополнения в форме Изменений, внесенные в НД – № ЛП 002408-210314 «Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения» в раздел «Подлинность», позволят проводить более достоверную идентификацию данного лекарственного препарата.

Результаты внедрения: предлагаемая методика установления подлинности каротиноидов методом ТСХ, изученная и апробированная в условиях контрольно-аналитической лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ», рекомендована для внесения в проект Изменений № 1, раздел «Подлинность» к НД – № ЛП 002408-210314 «Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения».

Начальник лаборатории ОКК,
доктор фармацевтических наук,
профессор РАН

И.Н. Зилфикаров



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ЗАО «ВИФИТЕХ»
(142279 Московская обл., Серпуховский район,
д. Оболенск, ГНЦ ЦМБ, корп. 84)

С.А. Постельников

» января 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предметы внедрения: результаты «слепой» сравнительной оценки пяти образцов облепихового масла методами ТСХ, ВЭЖХ и спектрофотометрии с целью выбора образца с оптимальной технологией получения и исходным сырьем.

Автор (разработчик): Курегян А.Г., доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ.

Источник информации: исследовательская работа, выполненная в рамках диссертационного исследования Курегян А.Г. на тему «Теоретическое и экспериментальное обоснование получения индивидуальных каротиноидов и создание на их основе лекарственных средств».

Где внедрено: фармацевтическое предприятие ЗАО «ВИФИТЕХ».

Цель внедрения: оптимизация технологии получения лекарственного препарата, содержащего каротиноиды, - «Облепиховое масло, масло для приема внутрь, местного и наружного применения», выпускаемого ЗАО «ВИФИТЕХ».

Ответственный за внедрение: начальник лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ», доктор фармацевтических наук, профессор РАН И.Н. Зилфикаров.

Эффективность и значимость внедрения: результаты исследований, представленные во внедренческой документации, необходимы для оптимизации технологии и стандартизации облепихового масла в процессе его промышленного производства.

Начальник лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ»,
доктор фармацевтических наук,
профессор РАН

И.Н. Зилфикаров

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Для служебного пользования,
Экз. № 1

УТВЕРЖДАЮ

заместитель директора по науке
Пятигорского медико-фармацевтического
института – филиала ФГБОУ ВО
Минздрава России,
д. фарм. наук, профессор
 Д.А. Коновалов
«11» октября 2017 г.



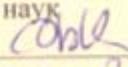
ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство микрокапсул с ликопином

Срок действия до «11» октября 2022 г.

СОГЛАСОВАНО

заведующий кафедрой технологии
с курсом медицинской
биотехнологии Пятигорского
медико-фармацевтического института –
филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава,
д. фарм. наук

 Д.В. Компанцев
«11» октября 2017 г.

г. Пятигорск

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «Витаукт-пром»

385774, Республика Адыгея

Майкопский район

Ст. Абадзехская

ул. Клубная, 59 «А»

А.Г. Гарбузов

«22» 11 2018 г.

АКТ

Предметы внедрения: результаты разработки технологии получения микрокапсул (стадия микрокапсулирования) с ликопином.

Автор (разработчик): Курегян А.Г., доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ.

Источник информации: исследовательская работа, выполненная в рамках диссертационного исследования Курегян А.Г. на тему «Теоретическое и экспериментальное обоснование получения индивидуальных каротиноидов и создание на их основе лекарственных средств».

Где внедрено: ООО «Витаукт-пром» 385774, Республика Адыгея, Майкопский район, станция Абадзехская, ул. Клубная, 59 «А».

Цель внедрения: апробация в производственных условиях и оптимизация технологии получения микрокапсул, содержащих индивидуальный каротиноид.

Ответственный за внедрение: директор по производству ООО «Витаукт-пром» Корочинский А.В.

Эффективность и значимость внедрения: результаты исследований, представленные в документации, свидетельствуют о реальных производственных возможностях предлагаемой лекарственной формы и позволяют в дальнейшем расширить ассортимент лекарственных средств, содержащих каротиноиды.

директор по производству
ООО «Витаукт-пром»
Корочинский А.В.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
 МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАЩЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ
 ПО МЕДИЦИНСКОМУ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМУ
 ОБРАЗОВАНИЮ ВУЗОВ РОССИИ**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ имени И.М. СЕЧЕНОВА
 119991, Москва, Трубетцкая ул., д. 8, стр. 2. Тел.: (495) 708-34-49, 622-97-80; (499) 246-24-11, 255-71-80(тел/факс)

№ 540/05.05-20
 30.12.2014

Директору Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации профессору В.Л. Аджиенко

Учебно-методическое объединение по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России, рассмотрев материалы рукописи:

• Курегян А.Г., Печинский С.В. «Хроматографические методы в анализе лекарственных средств»,

сообщает, что указанной рукописи присвоен гриф:

«Рекомендовано Учебно-методическим объединением по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебного пособия для обучающихся по основным профессиональным образовательным программам высшего образования – программам специалитета по специальности Фармация».

Зам. председателя УМО
 по медицинскому и фармацевтическому
 образованию вузов России,
 первый проректор
 ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
 Минздрава России, профессор

А.А. Свистунов

Входящий № 202
 24» 03 2014

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ПЯТИГОРСКИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

А. Г. Курегян, С. В. Печинский

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Учебное пособие

*Рекомендовано Учебно-методическим объединением
по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России
в качестве учебного пособия для обучающихся по основным
профессиональным образовательным программам высшего
образования – программам специалитета
по специальности «Фармация»*



Издательство
ВолГМУ
Волгоград
2017

УДК 615.2/.3.074:543.544.1(075.8)
 ББК 24.46:52.8
 КС № 540/05.05-20 от 30.12.2014 г.
 К 93

Рецензенты:

заведующий кафедрой фармацевтической химии
 и фармацевтической технологии ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный
 университет» д-р фарм. наук, профессор *А. И. Сливкин*;

заведующий кафедрой фармации Уральского государственного
 медицинского университета д-р фарм. наук, профессор *А. Ю. Петров*

*Печатается по решению ЦМК
 Пятигорского медико-фармацевтического института –
 филиала ФГБОУ ВО Волгоградского государственного
 медицинского университета МЗ РФ*

К 93

Курегян, А. Г.

Хроматографические методы в анализе лекарственных
 средств: учебное пособие / А. Г. Курегян, С. В. Печинский. –
 Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал
 ФГБОУ ВО ВолГМУ МЗ РФ. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ,
 2017. – 80 с.

ISBN 978-5-9652-0474-8

Учебное пособие «Хроматографические методы в анализе лекарственных
 средств» предназначено для студентов, обучающихся по специальности высшего
 образования «Фармация». В пособии рассматриваются основные теоретические
 основы хроматографических методов, в частности, ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ. Пособие
 содержит тестовые задания, примеры решения задач, ситуационные задачи.

УДК 615.2/.3.074:543.544.1(075.8)
 ББК 24.46:52.8

ISBN 978-5-9652-0474-8

© Волгоградский государственный
 медицинский университет, 2017
 © Издательство ВолГМУ, 2017



Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
«Уральский государственный
медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России)
ул. Репина, 3, г. Екатеринбург, 620028
Тел. (343) 371-34-90; факс 371-64-00
E-mail: usma@usma.ru
ИНН/КПП 6658017389/665801001
01.03.2018 г. № 500
на № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Проректор ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава РФ по
учебной работе

А.В. Зырянов
А.В. Зырянов



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предметы внедрения: 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)

Автор: Курегян А.Г., доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ.

Печинский С.В. старший преподаватель кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ.

Источник информации: исследовательская работа, выполненная в рамках диссертационного исследования Курегян А.Г. на тему «Теоретическое и экспериментальное обоснование получения индивидуальных каротиноидов и создание на их основе лекарственных средств».

Где внедрено: ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет, фармацевтический факультет, кафедра фармации.

Цель внедрения: использование в учебном процессе при изучении хроматографических методов, в частности, тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Ответственный за внедрение: профессор Петров А. Ю.

Заведующий кафедрой фармации
ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России,
доктор фармацевтических наук, профессор

А. Ю. Петров
А. Ю. Петров

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по учебной и
воспитательной работе Пятигорского
медико-фармацевтического института –
филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ»
Минздрава России, д.мед.н



А.В. Воронков А.В. Воронков
201 8 г.

АКТ

о внедрении результатов научно-исследовательской работы в учебный процесс

Предметы внедрения: 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)

Автор: Курегян А.Г., доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России.

Печинский С.В., старший преподаватель кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России.

Источник информации: исследовательская работа, выполненная в рамках диссертационного исследования Курегян А.Г. на тему «Теоретическое и экспериментальное обоснование получения индивидуальных каротиноидов и создание на их основе лекарственных средств».

Где внедрено: кафедра фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Цель внедрения: использование в учебном процессе при изучении хроматографических методов, в частности тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), с целью приобретения навыков фармакопейного анализа органических ЛС.

Заведующий кафедрой
фармацевтической и токсикологической химии
Пятигорского медико-фармацевтического института –
филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский
государственный медицинский
университет» Минздрава России, профессор

Д.С. Лазарян Д.С. Лазарян



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

**«Всероссийский научно-исследовательский институт
лекарственных и ароматических растений»
(ФГБНУ ВИЛАР)**

117216, Москва, ул. Грина, 7
Тел. (495) 388-55-09
Факс (495) 712-09-18
e-mail: vilarnii@mail.ru
www.vilarnii.ru

От 14.05.2018 г. № 52615/241
на № _____ от _____



Утверждаю
Директор, чл.-корр. РАН
Н.И. Сидельников

«14» / 05 / 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ
в учебный процесс учебного пособия
«Хроматографические методы в анализе лекарственных средств»

Предмет внедрения: 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)

Автор: Курегян А.Г., доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ.

Печинский С.В., старший преподаватель кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ.

Источник информации: исследовательская работа, выполненная в рамках диссертационного исследования Курегян А.Г. на тему «Теоретическое и экспериментальное обоснование получения индивидуальных каротиноидов и создание на их основе лекарственных средств».

Где и кем внедрено: в учебный процесс для аспирантов ФГБНУ ВИЛАР, обучающихся по направлению подготовки 33.00.00 Фармация, направленность (профиль) «Технология получения лекарств» «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» на лекционных и семинарских занятиях по темам «Стандартизация и нормирование качества лекарственного растительного сырья», «Современные методы анализа», «Разработка лекарственных препаратов с использованием субстанций растительного происхождения».

Цель внедрения: использование в учебном процессе при изучении хроматографических методов, в частности, тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для аспирантов

Эффективность и целесообразность внедрения: представленные результаты научной работы позволяют аспирантам приобрести практические навыки контроля качества субстанций и лекарственных форм на их основе, расширить представления о современных методах анализа лекарственных препаратов, изучить хроматографические методы анализа, в частности, тонкослойную хроматографию (ТСХ) и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), а также способствуют закреплению знаний, приобретенных в результате обучения по направлению подготовки 33.00.00 Фармация.

Ответственный за внедрение:

Ведущий научный сотрудник, к.фарм.н.
Зав. научно-организационного отдела, к.фарм.н

Тертичная Ю.М.
Семкина О.А.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
 МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ
 ПО МЕДИЦИНСКОМУ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМУ
 ОБРАЗОВАНИЮ ВУЗОВ РОССИИ**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ имени И.М. СЕЧЕНОВА
 119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2. Тел.: (495) 708-34-49, 622-97-80; (499) 246-24-11, 255-71-80(тел/факс)

№ 355/05.05-20
 08.10.2014

Директору Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации профессору В.Л. Аджиенко

Учебно-методическое объединение по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России, рассмотрев материалы рукописи:

• Курегян А.Г., Печинский С.В., Тираспольская С.Г. «Спектроскопия в инфракрасной области и ее использование в фармацевтическом анализе»,

сообщает, что указанной рукописи присвоен гриф:

«Рекомендовано Учебно-методическим объединением по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебного пособия для обучающихся по основным профессиональным образовательным программам высшего образования – программам специалитета по специальности Фармация».

Зам. председателя УМО
 по медицинскому и фармацевтическому
 образованию вузов России,
 проректор по учебной работе
 ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
 Минздрава России,
 профессор



А.А. Свистунов

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

КАФЕДРА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ
И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Курегян А.Г., Печинский С.В.,
Тираспольская С.Г.

**СПЕКТРОСКОПИЯ
В ИНФРАКРАСНОЙ ОБЛАСТИ
И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ**

*Учебное пособие
Рекомендовано Учебно-методическим объединением
по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России
в качестве учебного пособия для обучающихся по основным
профессиональным образовательным программам высшего
образования – программам специалитета
по специальности «Фармация»*

Пятигорск
РИА-КМВ
2019

УДК 615.074:543.422

ББК 24.46

К93

Рецензенты:

Заведующий кафедрой фармации Кубанского государственного
медицинского университета, доктор фармацевтических наук,
профессор **А.М. Сампиев**

Заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии НИУ
«БелГУ», доктор фармацевтических наук, профессор **О.О. Новиков**

*Печатается по решению ЦМК
Пятигорского медико-фармацевтического института –
филиала ФГБОУ ВО «Волгский государственный
медицинский университет» МЗ РФ*

К93 Курегян А.Г., Печинский С.В., Тираспольская С.Г.
Спектроскопия в инфракрасной области и ее использование в
фармацевтическом анализе: учебное пособие / А.Г. Курегян, С.В.
Печинский, С.Г. Тираспольская. – Пятигорск: Рекламно-информа-
ционное агентство на Кавминводах, 2019. – 92 с.

ISBN 978-5-89314-910-4

Учебное пособие «Спектроскопия в инфракрасной области и ее использо-
вание в фармацевтическом анализе» предназначено для студентов, обучающихся по
специальности высшего образования «Фармация».

В пособии рассмотрены теоретические аспекты метода ИК-спектроскопии,
этапы проведения анализа веществ этим методом: подготовка образца, регистра-
ция спектров, идентификация веществ с помощью ИК-спектров. Пособие содер-
жит вопросы для самоконтроля и индивидуальные задания.

УДК 615.074:543.422

ББК 24.46

ISBN 978-5-89314-910-4

© Пятигорский медико-
фармацевтический институт –
филиал ФГБОУ ВО
ВолГМУ МЗ РФ, 2019

© Курегян А.Г., © Печинский С.В.,
Тираспольская С.Г., 2019

© Рекламно-информационное
агентство на Кавминводах, 2019

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по учебной и воспитательной работе Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России, д.мед.н, профессор

 _____ А.В. Воронков
 « 23 апреля » 2019 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предметы внедрения: 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 08.10.20104)

Автор: Курегян А.Г., доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России.

Печинский С.В., старший преподаватель кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России.

Источник информации: исследовательская работа, выполненная в рамках диссертационного исследования Курегян А.Г. на тему «Теоретическое и экспериментальное обоснование получения индивидуальных каротиноидов и создание на их основе лекарственных средств».

Где внедрено: кафедра фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Цель внедрения: использование в учебном процессе при изучении метода ИК-спектроскопии.

Заведующий кафедрой
 фармацевтической и токсикологической химии
 Пятигорского медико-фармацевтического
 института –
 филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский
 государственный медицинский университет»
 Минздрава России, профессор



Д.С. Лазарян