

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

на правах рукописи

ЗЕМЦОВА НАТАЛЬЯ ПЕТРОВНА
РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРЕПАРАТА
ОБЩЕТОНИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ
МАРАЛА ПАНТОВ ИЗМЕЛЬЧЕННЫХ

14.04.01 - Технология получения лекарств

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель – доктор
фармацевтических наук, профессор
В.Ф. Турецкова

Барнаул – 2019

Сокращения

АГМУ - алтайский государственный медицинский университет

АПК - агропромышленный комплекс

БАВ - биологически активные вещества

БАД - биологически активные добавки

ВНИИ - всероссийский научно-исследовательский институт

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФ - государственная фармакопея

ЖКТ - желудочно – кишечный тракт

МБЧ - микробиологическая чистота

МПИ – марала панты измельченные

НД - нормативный документ

ОПХ - опытно-промышленное хозяйство

ОФС - общая фармакопейная статья

СО - стандартный образец

ТСХ - тонкослойная хроматография

ТУ - технические условия

ТФУК - трифторуксусная кислота

ФБУЗ - федеральное бюджетное учреждение здравоохранения

ФГБУ - федеральное государственное бюджетное предприятие

ФИТЦ - фенилизотионинат

ФТК - фенилтиокарбамильные производные

ХС - хроматографическая система

ЦНС - центральная нервная система

Введение	6
ГЛАВА I. МАРАЛА ПАНТЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ОБЩЕТОНИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ	13
1.1. Общие сведения о марала пантах и способах их первичной переработки	13
1.2. Сырьевая база и современное состояние пантового оленеводства	17
1.3. Срезка, консервирование и способы первичной переработки марала пантов	18
1.4. Биологически активные вещества марала пантов	21
1.5. Данные народной медицины и фармакологическая изученность марала пантов	27
1.6. Препараты на основе марала пантов и их применение в медицине	30
Выводы по главе	33
ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
2.1. Выбор объекта исследования	35
2.2. Методы исследования, используемые при изучении качественного состава биологически активных веществ	36
2.3. Методы исследования количественного содержания аминокислот в марала пантах измельченных	38
2.4. Методы исследования физико-химических, технологических свойств материалов и оценки качества экспериментальной лекарственной формы	39
2.5. Методы фармакологических исследований	42
2.6. Статистическая обработка результатов	44
ГЛАВА III. ПОЛУЧЕНИЕ МАРАЛА ПАНТОВ ИЗМЕЛЬЧЕННЫХ ПО ТРАДИЦИОННОЙ ТЕХНОЛОГИИ И ОЦЕНКА ИХ КАЧЕСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ ВАЛИДИРОВАННЫХ МЕТОДИК	46
3.1. Получение марала пантов измельченных по традиционной технологии	46
3.2. Выбор показателей качества марала пантов измельченных и методик их определения	48
3.3. Валидационная оценка методик качественного анализа аминокислот марала пантов измельченных	49
3.4. Валидационная оценка методики количественного определения аминокислот	54

3.5. Оценка качества марала пантов измельченных, полученных по традиционной технологии	67
Выводы по главе	72
ГЛАВА IV. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ, СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ МАРАЛА ПАНТОВ ИЗМЕЛЬЧЕННЫХ	76
4.1. Влияние способов дополнительной обработки марала пантов измельченных на их микробиологическую чистоту	76
4.2. Влияние обработки ионизирующим излучением марала пантов измельченных на качественный и количественный состав аминокислот	82
4.3. Влияние обработки ионизирующим излучением марала пантов измельченных на их общетонизирующую активность	83
4.4. Разработка технологической схемы получения марала пантов измельченных	86
4.5. Стандартизация марала пантов измельченных	88
4.6. Оценка стабильности марала пантов измельченных в условиях стресс-испытаний и прогнозирование сроков годности	91
4.6.1. Оценка стабильности марала пантов измельченных в условиях стресс - испытаний .	91
4.6.2. Прогнозирование сроков годности марала пантов измельченных	97
4.7. Определение острой токсичности и общетонизирующей активности марала пантов измельченных	98
4.7.1. Определение острой токсичности марала пантов измельченных	98
4.7.2. Определение общетонизирующей активности марала пантов измельченных	99
Выводы по главе	101
ГЛАВА V. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ КАПСУЛ «ПАНТОКАП», СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ	105
5.1. Определение общетонизирующей активности марала пантов измельченных в различных дозах	105
5.2. Изучение технологических свойств марала пантов измельченных	107
5.3. Выбор состава прописи капсул «Пантокап»	109
5.4. Разработка технологической схемы получения капсул «Пантокап»	113
5.5. Стандартизация качества капсул «Пантокап»	118

5.6. Долгосрочные испытания стабильности капсул «Пантокап»	123
Выводы по главе	123
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	125
Список литературы	128
Приложения	148

Введение

Актуальность темы исследования

Марал - ценный и значимый вид животного для отрасли Алтайского края, являющийся источником для получения пантовой продукции и крупной экспортной составляющей во внешнеэкономической деятельности. Традиционно марала панты широко используются в странах Юго-Восточной Азии, а с конца 20 века мараловодство как отрасль появилась в России, Новой Зеландии, Австралии, Канаде [61, 65, 87]. В настоящее время в России разведение маралов сосредоточено в Горном Алтае и предгорных районах Алтайского края, где ежегодно производится более 70% всей пантовой продукции России. На более 80 фермах разных форм собственности содержится свыше 70 тыс. оленей, от которых ежегодно получают более 60 тонн пантов [62,73].

Учитывая значимость пантовой продукции, на Алтае были реализованы и продолжают действовать ряд государственных и региональных программ, которые стали основой комплексной переработки и грамотного продвижения пантовой продукции на территории края и в других регионах. Приоритетным направлением является уменьшение экспорта ценного сырья и увеличение объема переработки пантов для реализации на территории РФ [53, 82, 83, 84, 93]. Значимость пантовой продукции подтверждается проведением в 2018 году в Алтайском крае «Всемирного конгресса оленеводов» [54, 78].

Марала панты (*Antlers Cervus elaphus sibiricus*) содержат сложный комплекс биологически активных соединений с разнообразной биологической активностью, таких как: аминокислоты, липиды, нуклеиновые кислоты, гормоны, факторы роста и витамины [59, 64, 148, 166]. Обращает на себя внимание тот факт, что основная масса биологически активных веществ марала пантов имеет белковую природу и, следовательно, их структура представлена аминокислотами.

Многолетний опыт народной медицины и изучения профилактического и лечебного действия марала пантов свидетельствует о том, что они обладают общетонизирующим, адаптогенным действием и применяются при упадке сил, умственных, физических нагрузках, при астенических состояниях, неврозах и после перенесенных травм [2, 50, 65, 68, 101].

Интерес к препаратам, получаемым на основе марала пантов, в России за последние годы резко возрос. В настоящее время качество марала пантов определяется ГОСТом 4227-76, большую часть пантов перерабатывают ряд крупных предприятий,

таких как: ЗАО «Вифитех», ЗАО «Эвалар», они занимаются производством лекарственного средства – пантокрин, но в большинстве случаев производственные компании широко используют марала панты в измельченном виде для получения биологически-активных добавок, которые применяются внутрь в виде капсул, смесей с экстрактами растений и т.д. [25]. По мнению производителей, использование нативного сырья способствует сохранению комплекса биологически активных веществ, обуславливающих многогранную фармакологическую активность марала пантов [42, 45, 47, 79, 98].

Обращает на себя внимание тот факт, что в литературе отсутствуют сведения о разработке оптимального состава и рациональной технологии получения данных препаратов, оценка качества исходного сырья и готовой продукции проводится по товароведческим показателям (внешний вид, влажность), при этом ни содержание основных групп биологически активных веществ, ни биологическая активность в сырье и готовой продукции не определяется. Указанные требования нормативной документации не позволяют в полной мере оценить качество и подлинность исследуемого сырья. Анализ продукции фирм, выпускающих капсулированные формы с марала пантами измельченными, свидетельствуют о том, что в настоящее время нет единого мнения по выбору оптимальной дозы, их условиям хранения и срокам годности марала пантов измельченных.

Исходя из вышеизложенного, исследования по разработке технологии и стандартизации препарата на основе марала пантов измельченных представляются актуальными.

Степень разработанности темы исследования.

Основная часть исследований по марала пантам в России и за рубежом посвящена их химическому и фармакологическому изучению. Отечественные исследования последних лет в области изучения продуктов пантового оленеводства в основном направлены на их применение в курортологии и восстановительном лечении [1, 2, 44, 49]. В последние годы особое внимание зарубежными учеными уделяется способности марала пантов к регенерации и поиску биологически активных веществ, ответственных за данный процесс [151, 152]. Кроме того, имеется ряд работ, посвященных разработке экстракционных препаратов на основе марала пантов [66, 67, 127, 148, 158]. Но при этом, практически не освещенными остаются вопросы разработки оптимальной технологии и стандартизации препаратов на основе марала пантов измельченных.

Цель и задачи исследования. Разработка научно-обоснованной технологии препарата общетонизирующего действия на основе марала пантов измельченных и его стандартизация.

Для достижения поставленной цели требовалось решение следующих задач:

1. Получить марала панты измельченные с использованием традиционной технологии и провести оценку их качества.
2. Предложить современные методики качественного и количественного анализа аминокислот в марала пантах измельченных и провести их валидационную оценку.
3. Выбрать оптимальные способы дополнительной обработки марала пантов измельченных, обеспечивающие их надлежащую микробиологическую чистоту.
4. Изучить влияние выбранных способов дополнительной обработки марала пантов измельченных на содержание в них аминокислот и общетонизирующую активность.
5. Разработать рациональную технологию марала пантов измельченных, провести их стандартизацию и составить проекты нормативной документации.
6. Изучить стабильность марала пантов измельченных в условиях стресс-испытаний и естественных условиях хранения.
7. Экспериментально обосновать состав и оптимальную технологию капсул «Пантокап», провести их стандартизацию, изучить стабильность и составить проекты нормативной документации.

Научная новизна. Впервые разработана научно-обоснованная технология получения марала пантов измельченных, осуществлен выбор оптимальной измельченности и способа дополнительной обработки марала пантов измельченных с целью обеспечения их надлежащего качества; впервые проведено изучение влияния различных видов дополнительной обработки (УФ - и СВЧ - излучение, термическая обработка, ионизирующее излучение, спирт этиловый) на микробиологическую чистоту марала пантов измельченных.

Впервые показано, что обработка ионизирующим излучением не оказывает влияния на общетонизирующую активность марала пантов измельченных и экспериментально обоснована их терапевтическая доза в капсулах «Пантокап». Подобран оптимальный состав капсулируемой массы на основе марала пантов измельченных.

Впервые для оценки качества марала пантов измельченных и капсулированного препарата на их основе предложена современная валидированная методика

качественного анализа и количественного определения аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также показатели и нормы качества.

Впервые изучено влияние внешних факторов (свет, температура, влажность) на стабильность марала пантов измельченных в стресс-условиях.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в разработке научно-обоснованной технологии препаратов на основе марала пантов измельченных, обеспечивающих их стабильность, надлежащую микробиологическую чистоту и обшлетонизирующую активность.

Практическая значимость диссертационного исследования состоит в разработке технологий марала пантов измельченных и препарата обшлетонизирующего действия на их основе в виде капсул «Пантокап». При этом установлена необходимость удаления кожного покрова, выбран оптимальный размер частиц (не более 0,3 мм) и способ дополнительной обработки сырья (ионизирующее излучение), обеспечивающих надлежащее качество готового продукта, разработана технологическая схема с указанием критических контрольных точек.

Разработан состав капсулированного препарата с выбором вспомогательных веществ и выбран номер желатиновых капсул. Предложены показатели, нормы качества и современные валидированные методики определения основных аминокислот марала пантов измельченных и разработанного капсулированного препарата.

Разработаны проекты нормативной документации «Марала панты измельченные», «Капсулы Пантокап 0,20», лабораторные регламенты на производство марала пантов измельченных и капсул «Пантокап 0,20».

Методология и методы исследования. Методологический подход базируется на выполнении комплекса теоретических, технологических, физико-химических, биофармацевтических, микробиологических и фармакологических исследований, обеспечивающих разработку качественных, эффективных и безопасных средств.

Положения, выносимые на защиту

- результаты оценки качества марала пантов измельченных, полученных по традиционной технологии;
- данные валидационной оценки и апробации методик качественного и количественного анализа аминокислот в марала пантах измельченных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии;
- данные по выбору оптимального способа дополнительной обработки марала пантов измельченных, обеспечивающие их надлежащую микробиологическую чистоту;

- результаты изучения влияния выбранного способа дополнительной обработки марала пантов измельченных на содержание в них аминокислот и их общетонизирующую активность;
- итоги изучения стабильности марала пантов измельченных в условиях стресс-испытаний и естественных условиях хранения;
- результаты экспериментальных исследований по разработке технологии, состава и оценке качества марала пантов измельченных, капсул «Пантокап 0,20» на основе марала пантов измельченных, условий и сроков их хранения.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты и основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на международных, всероссийских конференциях и конгрессах, а также конференциях местного уровня: межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 145-летию курорта Белокуриха, 75-летию Алтайского края» (Белокуриха, 2012); юбилейной научно-практической конференции «Медицинская наука и здравоохранение», посвященная 60-летию АГМУ (Барнаул, 2014); научной конференции в рамках проведения Дня российской науки (Барнаул, 2014г., 2015г.); VIII международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты современной науки» (Белгород, 2015); V юбилейной Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2015); I междисциплинарном конгрессе «Продукция на основе сырья пантового оленеводства. Актуальные проблемы и перспективы её использования в медицине и спорте высших достижений» (Барнаул, 2015); IV всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Беликовские чтения» (Пятигорск, 2015); краевой научно-практической конференции «Фармация Алтая. Ретроспектива и взгляд в будущее» (Барнаул, 2015); всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы современной фармацевтической технологии» (Пятигорск, 2016); X международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития науки и технологий» (Белгород, 2016);

Внедрение результатов исследования. На основании проведенных исследований разработаны: проект НД «Марала панты измельченные», проект НД «Капсулы Пантокап 0,20», лабораторный регламент на производство марала пантов измельченных и лабораторный регламент на производство капсул «Пантокап 0,20». Разработанные технологии получения марала пантов измельченных и капсул

«Пантокап» апробированы с положительным результатом ООО «Алтайдар» (г. Барнаул) (акты от 09.04.2018г, 17.04.2018г). Материалы диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре фармации ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России (акт от 15.01.2019г).

Личный вклад автора. Автор диссертационной работы принимал участие в выборе объектов исследования, постановке целей и задач, определении плана исследований. Самостоятельно осуществил поиск и анализ литературных данных, выполнил комплекс экспериментальных исследований, провел статистическую обработку и интерпретацию полученных результатов. Экспериментальная работа осуществлялась автором лично, на кафедре фармации ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава РФ. Оформлены статьи, диссертация и автореферат по материалам исследований. Автор на 90% является основным исполнителем исследования. Остальные 10%, а именно: определение микробиологической чистоты марала пантов измельченных проводилось в Барнаульском филиале ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту», обработка ионизирующим излучением осуществлялась в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск), содержание радионуклидов в ФГБУ «Центральная научно-производственная ветеринарная радиологическая лаборатория».

Связь темы диссертации с планом основных научно-исследовательских работ. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (номер государственной регистрации - 01200600351).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.01 - технология получения лекарств, а именно пунктам: 1 - исследования теоретических основ фармацевтической технологии, валидации, управления рисками, перенос технологии с этапа фармацевтической разработки в серийное производство, 3 - разработка технологии получения субстанции и готовых лекарственных форм, 4- исследования по изучению особенностей технологии получения готовых лекарственных форм из различных видов субстанций, сырья и вспомогательных веществ.

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 17 статей, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ и международные базы цитирования.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 171 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, пяти глав, общих выводов и списка литературы, включающего 171 источник, в том числе 49 иностранных; содержит 33 таблицы, 25 рисунков, 12 приложений.

ГЛАВА I. МАРАЛА ПАНТЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ОБЩЕТОНИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ

1.1. Общие сведения о марала пантах и способах их первичной переработки

Настоящие, или благородные олени известны с древности. Первые упоминания встречаются в традиционной китайской медицине во 2 веке до н.э. В Россию знания о лечебных свойствах пантовых оленей пришли из Китая лишь в 18 веке. К. Линней (1758) рассматривал всех настоящих оленей, населяющих Европу, Азию и Северную Америку, как один вид - *Cervus elaphus*. Долгое время маралы считались самостоятельным видом из рода оленей, однако в середине XX века систематика этих животных была сформирована окончательно, и с тех пор маралов классифицируют как подвид (популяция) благородного оленя [32, 115, 139].

Согласно современной классификации благородные олени относятся к типу хордовых, классу Млекопитающих, отряду Парнокопытных, подотряду Жвачные, семейству олени. По данным П.В. Митюшева (1950) благородные олени относятся к роду "олени", который представлен двумя под родами: настоящие олени (подвиды: марал, изюбр и вапити) и пятнистые олени [31, 61, 76].

В России распространены три подвида пантовых оленей: марал - *Cervus elaphus sibiricus* Severtzov (1873), изюбр - *Cervus elaphus xanthopygus* Milne – Edwards (1869) и пятнистый олень – *Cervus nippon hortulorum* Swihoe (1864), неокостеневшие рога которых (панты) используются для лекарственных целей [19, 61, 76].

Маралы — классические растительноядные животные, питаются бобовыми, злаковыми, хвойными культурами, пополняют недостаток минералов в организме, пользуясь минеральными источниками (почва, вода, солончаки) (рис.1.1). Среди всех разновидностей своего вида маралы отличаются самыми крупными размерами. Масса взрослых самцов доходит до 300-350 кг при длине тела до 260 см и высоте в холке около 150-155 см. В природе олени живут 12-14 лет, но в условиях животноводческих хозяйств могут легко преодолевать рубеж и в 25 лет и более [30, 32, 61].



Рис. 1.1. Марал (*Cervus elaphus sibiricus*)

Одним из важных факторов является место обитания маралов. Алтайский край, особенно горная и предгорная часть, Горный Алтай – естественный ареал обитания пантовых оленей и одновременно уникальная природно-климатическая зона наиболее благоприятная для их разведения. Считают, что удаленность от крупных индустриальных районов страны, практически не тронутых пока современной цивилизацией, делают данный регион экологически чистой зоной. Сочетание в комплексе таких факторов, как климатические условия, разнообразная кормовая база, богатая флора, состав почвы, воды и определенная высота над уровнем моря, видимо, и определяют особенности метаболизма оленя [77, 87].

Особую ценность, как в России, так и за рубежом представляют рога марала. Рога представляют собой вторичный половой признак и характерны только для самцов. Форма, размер рога, количество отростков являются важными показателями качества пантов и влияют в конечном итоге на стоимость. Рога маралов отличаются большими размерами, имеют 6-7 отростков, стволы рогов широко раскинуты в стороны [16, 61, 63, 149].

Многие ученые по форме и размерам рога настоящих оленей разделяют на три основных типа рогов. В каждом типе всегда имеются: первый надглазный отросток; второй надглазный, или ледяной; третий, или средний; четвертый; последующие отростки образуют «крону». Количество отростков очень изменчиво и при этом наибольшего развития достигает первый или третий отросток. Различают три типа рогов: средневропейский, хангуловый и мараловый [35, 74, 119].

По данным В.И. Цалкина (1946) для маралов характерны рога маралового типа, которые достигают наибольших размеров, имеют обычно не более 6-7 отростков и не образуют «кроны». Первый надглазный, ледяной и средний отростки развиты хорошо,

наибольшей величины достигает четвертый отросток, образуя резкий изгиб назад. Рога маралового типа поставлены друг к другу под относительно тупым углом, т. е. стволы резко раскинуты в стороны. Сбрасывание рогов происходит с конца марта до начала мая [112, 120].

Панты - это молодые, неокостеневшие рога марала, имеющие трубчатую структуру и наполненные кровью, покрытые тонкой кожей с короткой и очень мягкой шерстью, снятые в период их роста [60, 90]. Панты срезают у оленей с 2-летнего возраста. Панты от 2-летних рогачей называют первыми рогами, а самих животных – перворожками. С возрастом панты становятся более крупными и мощными [30, 61, 120].

В феврале – марте маралы скидывают старые рога и у них активно начинают расти новые панты. Средняя скорость роста пантов в сутки 10–12 мм, некоторые ученые отмечают, до 25 мм в сутки [61, 115]. Традиционно заготовку пантов производят в мае - начале июня. В это время они мягкие и богаты кровеносными сосудами с максимальным содержанием БАВ. К концу июня рога начинают костенеть, после чего утрачивают ценность. После срезки пантов оставшаяся часть («коронка») претерпевает те же изменения (окостенение, очищение кожи, сбрасывание), что и у оленей, у которых панты не срезаны. С возрастом панты становятся более крупными и мощными. Масса пантов у рогачей с возрастом очень сильно изменяется. У маралов с 2 - до 6 - летнего возраста прирост составляет 4 кг, или 44%, с 6 - до 10 –летнего – 2 (22%), с 10 до 12 лет – 1,2 кг (13%), с 12 - летнего возраста пантовая продуктивность начинает снижаться [61, 74, 119].

У маралов количество отростков продолжает увеличиваться до 4-5 лет. Полного развития панты достигают у самцов в возрасте 7–8 лет. До 11–12 лет вес и размеры пантов остаются без изменения, затем идет их снижение. В возрасте 12-14 лет у маралов начинает уменьшаться количество отростков в связи со старением организма [16, 61, 63, 119].

Принятый во второй половине XX века ГОСТ 4227-76 «Марала панты и изюбра консервированные. Технические условия» не потерял актуальности и в настоящее время в России регламентирует качество марала пантов в зависимости от категории. Согласно данному нормативному документу деление пантов на категории проводят по таким показателям, как внешний вид, внешние признаки окостенения, обхват ствола, длина ствола, цвет на продольном и поперечном срезах, масса. В зависимости от характера и величины механического повреждения пантов в пределах каждого сорта различают

малый и большой дефекты. Характер и количество дефектов учитывается при делении пантов на категории [23, 61].

С ростом пантов в них увеличивается содержание золы, кальция и фосфора. Уменьшается количество органических веществ, в состав которых входят биологически активные вещества (БАВ), поэтому при срезке пантов до наступления технической зрелости они имеют меньшую массу, на более поздней стадии получают панты большей массы, но сильно окостеневшие и худшего качества [63, 67, 90].

При сравнительной оценке требований нормативной документации и данных литературы по определению категорий существенных различий нами не выявлено. Согласно техническим требованиям стандартов панты оленей должны быть не окостенелыми, с наличием кожного и волосяного покрова и срезаны с животного в возрасте не моложе 2 лет [22, 23].

Согласно данным стандарта качества Департамента сельского хозяйства Китая марала панты также оценивают по таким показателям, как внешний вид (цвет на продольном и поперечном срезах), запах, внешние признаки окостенения, размер (обхват ствола, длина ствола), масса, отсутствие плесени, примесей и наличия насекомых [122].

Таким образом, деление пантов на категории проводят по таким показателям, как внешний вид, внешние признаки окостенения, обхват ствола, длина ствола, цвет на продольном и поперечном срезе, масса, но при этом не учитывается содержание в них биологически-активных веществ (БАВ).

Согласно данным литературы, марала панты представляют собой сложный орган, который состоит из разнообразных, большей частью молодых, растущих и дифференцирующих тканей. На поперечном разрезе можно ясно различить три слоя с четкими границами. Наружный слой - шкурка или кожа, средний слой или промежуточный и внутренний слой или мозговой [55, 90, 116].

Верхний слой (кожа) состоит из многослойного мостовидного эпителия, сосочки которого вдаются в соединительнотканый слой. В базальной части находится коричневого цвета пигменты, а на поверхности – тонкий роговой слой. Перпендикулярно к поверхности панта расположены волосяные сумки, погруженные в соединительную ткань. Волосяной стержень незначительно выступает над поверхностью кожи [116, 119].

Под эпителием расположен соединительнотканый слой кожи толщиной около 0,2 мм. В коже много сальных желез, открывающихся в волосяные сумки. Между

соединительнотканными пучками кожи проходят сосуды типа артериальных и венозных. Промежуточный слой в растущей верхушке панта состоит из соединительной ткани: клетки мелкие, веретенообразной формы. Промежуточный слой является зародышевым слоем панта, в нем много сосудов, расположенных в основном на границе с кожей [116].

Мозговой или центральный слой очень богат тонкостенными сосудами, группирующимися по несколько вместе. Они окружены кольцом рыхлой соединительной ткани, которая делит паренхиму этого слоя на пучки. В основном ткань мозгового слоя имеет однородный рисунок. По мере удаления от верхушки соединительная ткань превращается в хрящевую и даже костную [55, 116, 119].

Ближе к основанию центральная часть панта занята костной тканью. Она образуется на месте хряща при помощи остеобластов. Костные балки тоньше хрящевых, в наружных слоях кости они представлены рыхлой соединительной тканью, в которой проходят сосуды [55, 116].

Таким образом, панты представляет собой большей частью костно - хрящевую ткань, пронизанную множеством кровеносных сосудов, что дает возможность предполагать достаточную однородность химического состава панта.

1.2. Сырьевая база и современное состояние пантового оленеводства

Марал - ценный и очень значимый вид животного для отрасли Алтайского края, т.к. является основным источником пантовой продукции. Мараловодство на Алтае развивается уже более века, став одним из самых перспективных направлений в отечественном животноводстве. В настоящее время маралов разводят в питомниках и специализированных хозяйствах для получения пантов [53, 54, 62, 72].

Основное поголовье пантовых оленей России представлено маралами и сосредоточено в основном в Алтайском крае и Республике Алтай [12, 72, 78]. Пантовое оленеводство на сегодняшний день - это одна из рентабельных и динамично развивающихся отраслей сельского хозяйства. Республика Алтай и Алтайский край является лидерами по разведению маралов, а также крупнейшими производителями продукции пантового оленеводства в России и занимают соответственно первое и второе место в стране по количеству мараловодческих хозяйств. На более 80 фермах разных форм собственности содержится свыше 70 тыс. оленей, от которых ежегодно получают более 60 тонн пантов. Среди предприятий насчитывается более 20 крупных с размером стад до 2 и более тысяч голов. В настоящее время создана алтае - саянская

порода маралов, разведением которой занимаются наиболее крупные предприятия в республике Алтай: сельскохозяйственный производственный кооператив «Абайский», «Племхоз Теньгинский» и в Алтайском крае: опытно-производственное хозяйство «Новоталицкое», ООО «Каимское» [39, 67, 73].

Большая сырьевая база способствует совершенствованию технологии заготовки, внедрению эффективных способов переработки сырья и получения готовой продукции. Основная часть марала пантов традиционно экспортируется в Китай, Корею и страны Юго - Восточной Азии [54, 65, 68].

Развитию пантового оленеводства в регионе способствует государственная поддержка, оказываемая в рамках программ «Развитие сельского хозяйства Алтайского края» на 2013-2020 гг., «Развитие комплексной переработки продуктов пантового оленеводства в Алтайском крае» на 2011-2015 гг., направленная на эффективное и рациональное использование сырья, а также увеличение производства продукции пантового оленеводства. Правительством республики мараловодство также включено в приоритетный национальный проект «Развитие АПК», который предусматривает государственную поддержку из федерального бюджета. Главная задача пантового оленеводства сегодня – это улучшение качества консервированных пантов, что сделает еще более конкурентно-способной на мировом пантовом рынке [82, 83, 84, 93].

Цельные марала панты – одна из традиционных экспортных составляющих во внешнеэкономической деятельности Алтайского края и Республики Алтай. Российские производители, в отличие от производителей Кореи и Китая, используют марала панты измельченные или субстанции из продукции пантового оленеводства для дальнейшей переработки [54, 73, 105].

1.3. Срезка, консервирование и способы первичной переработки марала пантов

Панты получают путем срезки. Срезка пантов начинается со второго года жизни и проходит раз в год, с конца мая до конца июня - начала июля, когда рога маралов уже достаточного размера, но еще не окостенели. Окостенение происходит постепенно и зависит от ряда факторов. Поэтому «техническая зрелость», т.е. стадия роста, на которой панты представляют наибольшую ценность, определяется отдельно для каждого рогача [48, 58, 119].

Маралов содержат в полудиких условиях, площадь пастбищ одного хозяйства может исчисляться тысячами гектаров, каждый огороженный участок разделен на

секции для того, чтобы животные разных возрастов не смешивались, также это способствует контролю процесса размножения маралов [16, 60].

На мараловодческих фермах животных пригоняют с огороженных пастбищ, которые чаще всего находятся в горах, затем по одному через коридор загоняют в специальный станок, закрепляют голову и за две-три секунды электропилой спиливают рога. Затем обрабатывают срез специальной смесью, чтобы остановить кровь [58, 60, 81].

Сырой пант может храниться не более пяти суток, поэтому после срезки его сразу консервируют. Ранее способ консервирования был секретом мастера, но в настоящее время разработано достаточно способов консервирования пантов. Процесс обработки неокостеневших рогов марала очень длительный и трудоемкий. Консервирование пантов – это инактивация ферментов, удаление влаги, что обеспечивает стабильность товароведческих показателей и биологически-активных веществ, а также обеспечение дальнейшего хранения в течение длительного времени [60, 81].

Панты, прошедшие консервирование, должны соответствовать требованию ГОСТ 4227-76 «Марала панты и изюбра консервированные. Технические условия» [23].

Процесс консервирования также оказывает влияние на качество получаемых пантов. До сих пор в некоторых мараловодческих хозяйствах края применяют традиционный способ консервирования, который заключается в погружении пантов в котлы с горячей водой комлем вверх и варкой в течение нескольких минут. При этом время варки подбирается индивидуально, также как и количество погружений. Данный способ трудоемкий и требует высоких затрат, что зачастую приводит к снижению качества пантов [58].

В мараловодческих хозяйствах Алтая в основном применяется традиционный метод консервирования марала пантов – комбинированный, разработанный П.В. Митюшевым др. (1947) и позволил значительно снизить трудоемкость процесса. Данный метод заключается в варке пантов в горячей воде (96-98 °С) с последующей сушкой в ветровой сушилке и жаровой камере при температуре воздуха 70-90°С, которая повторяется многократно. В настоящее время им пользуются почти все мараловодческие хозяйства края. Вместе с тем, недостатком данного способа является длительность процесса и потеря части БАВ при варке [75].

Учитывая недостатки существующих методов, был предложен «паровой» способ консервирования, при котором варку чередуют с обработкой паром в специальной

камере (в течение 40-60 сек 3-4 раза). Рекомендуемый способ менее трудоемкий, но все-таки не исключает перечисленных выше недостатков [17].

Для улучшения качества пантов и равномерного распределения крови по пантам В.Г. Луницыным и др. (2008) был предложен усовершенствованный метод консервирования, при котором погружали панты в горячую воду (96-98°C) на 80-120 секунд с перерывом 60-90 секунд, увеличивая время отдыха до 2-3 минут, жаровые сушки проводят при температуре 65-70°C, обеспечивая тем самым температуру внутри панта не выше 52 °С. Данный метод был апробирован в ОПХ «Новоталицкое». Предложенный способ позволил повысить эффективность процесса консервирования за счет выхода более качественного сырья, сокращая время консервирования в 5 раз, снижает трудозатраты в 9 раз [59].

Вместе с тем, в последнее время происходит усовершенствование методик срезки пантов и их консервирования. К модернизированным способам консервирования относится дополнительное использование различных видов современных сушилок таких как сублимационная, вакуумная, инфракрасная и СВЧ-сушка [20, 21, 41, 115].

По мнению специалистов мараловодческих хозяйств, при оснащении мараловодческих предприятий необходимым оборудованием для сушки будет частично решена наиболее трудоемкая и затратная операция при консервировании марала пантов и позволит получать продукцию с высокой биологической активностью и сохранением комплекса БАВ [59,81].

В последние годы производственные компании Алтая широко используют марала панты в измельченном виде для получения биологических активных добавок (БАД), которые применяются внутрь в виде капсул, пантовых слайсов, смесей с экстрактами растений и т.д. По мнению производителей, использование нативного сырья способствует сохранению комплекса биологически активных веществ, обуславливающих многогранную фармакологическую активность марала пантов [3, 47, 79, 98].

В настоящее время существуют различные способы переработки сырья при получении измельченных марала пантов. Одним из основных различий применяемых технологий является отсутствие или наличие в технологическом процессе стадии «удаление кожного покрова» [8, 56, 57, 60].

Согласно данным литературы, кожный покров ухудшает товарный вид сырья и при этом значительно обсеменен разнообразной микрофлорой. Поэтому, несмотря на то, что технология «без удаления кожного покрова» для производителей является более

привлекательной с коммерческой точки зрения, так как удаление кожного покрова достаточно трудоемкий процесс, требующий дополнительных затрат, нами было дано предпочтение технологии «с удалением кожного покрова» [56, 60, 70, 71].

Таким образом, в настоящее время существуют различные технологии переработки сырья при получении марала пантов измельченных, которые, в основном, отличаются сохранением или удалением кожного покрова. Вместе с тем, кожный покров может быть значительно обсеменен микрофлорой, что может оказать влияние на качество конечного продукта.

1.4. Биологически активные вещества марала пантов

Традиционно изучением марала пантов активно занимаются в странах Юго-Восточной Азии (Китай, Корея, Япония), а с 70-х годов прошлого века к пантам марала проявили интерес и ученые таких стран как Новой Зеландии, Канада, Австралия, Америка [128, 134, 138, 144, 149].

В России систематическое и всестороннее (химическое, фармакологическое, клиническое) изучение марала пантов началось в 30-х годах 20 века под руководством профессора С.М. Павленко, который разработал методику изготовления из пантов лекарственного препарата «Пантокрин» и возглавил научную работу по изучению фармакодинамики и лечебного действия этого препарата [90, 99].

Минеральные вещества. Первые работы, посвященные углубленному изучению химического состава БАВ марала пантов, были проведены А.М. Тимофеевым с соавт. (1934), которые показали, что нет существенного различия химического состава пантов разных видов оленей (пятнистый олень, марал, изюбр) по содержанию таких элементов как кальций, фосфор, азот общий, аминогрупп и аммиака [106].

Более полная информация о химическом составе минеральных веществ марала пантов была получена А.Б. Силаевым с соавт. (1969). Авторами было отмечено, что минеральные вещества являются одной из обширных групп БАВ. Данными авторами обнаружены в пантах марала как макроэлементы (кальций, магний, железо, кремний, фосфор, натрий, калий), так и микроэлементы (никель, медь и др.). Учитывая, что панты представляют собой костно-хрящевую ткань, то доминирующее место в пантах занимают такие элементы как кальций и фосфор [100].

Дальнейшие комплексные исследования БАВ марала пантов, пантокрин и жмыха марала пантов были проведены О.М. Шампановой с соавт. (1976). Методом

спектрального анализа проведено изучение минерального состава исследуемых объектов, впервые показано наличие в пантокрине 20 микроэлементов [69, 102].

При изучении минеральных веществ марала пантов Н.С. Осинцевым с соавт. (1990) было выявлено, что в процессе развития пантов происходит активный обмен веществ, при этом ткани выполняют роль депо зольных элементов, что сопровождается абсорбцией кальция и др. и экскрецией калия, натрия, железа [88, 150, 152].

Исследования В.Г. Луницына (2007) по сравнительной оценке биохимических свойств марала пантов, обитающих в разных природно-климатических зонах Алтая, по содержанию макро- и микроэлементов подтвердили, что значительной разницы минерального состава пантов различных регионов нет [58].

Аминокислоты и их производные. Отечественными и зарубежными учеными отмечено, что аминокислоты являются одной из обширных и важнейших групп БАВ марала пантов. Комплексные исследования аминокислотного состава с применением методов ТСХ проведены С.М Павленко с соавт. (1969), П.А. Лунин (1987). Установлено наличие в пантокрине 16 природных аминокислот (с преобладающим содержанием глицина, аланина, пролина, лейцина, серина, треонина, лизина, глутаминовой кислоты) и пептидов. Эти аминокислоты содержатся как в плазме крови панта, так и могут образовываться в процессе автолиза белков и пептидов при консервировании пантов [55, 99, 100].

Отечественными и зарубежными учеными были идентифицированы шесть пептидов и один липопептид. В состав пептидов входит от 15 до 40 остатков различных аминокислот, при этом обращает на себя внимание высокое содержание амидов дикарбоновых кислот [55, 64, 90, 136, 140]. Исследования F. Wu et al. (2013), E. Zha et al. (2012), M. Liu et al. (2016), также указывают на наличие пептидов в пантах марала [131, 143, 156, 159, 164].

По данным исследований китайских ученых D. Lee et al. (2014), S. Wang et al. (2016) в марала пантах отмечено максимальное содержание глицина, пролина [141, 157].

Изучение изменений в химическом составе пантов, полученных общепринятым методом консервирования и паровым, было проведено В.С. Галкиным (1979). Результаты показали преобладание дикарбоновых аминокислот над диаминокарбоновыми и высокое содержание суммы глицина, валина, аланина и пролина [17].

Исследования В.Г. Луницына (2008) подтвердили, что химический состав марала пантов значительно зависит от способа консервирования. Предложен

усовершенствованный способ консервирования с увеличением содержания БАВ, биологической активности, а также улучшением органолептических показателей марала пантов [58, 60].

Исследования зависимости содержания БАВ от стадии роста пантов проведены Н.С. Осинцевым с соавт. (1990). Установлено, что терапевтическая активность препаратов из пантов оленей оценивается содержанием аминокислот и липидов, при этом с ростом панта и формированием отростков происходит накопление минеральных веществ и снижение концентрации свободных аминокислот (лизин, аргинин, глицин, серин, валин, лейцин и др.) и липидов [88].

S. Zhou et al (1979), V. Jeon et al (2009), Z. Sui et al (2014) выявлено, что с ростом пантов происходит снижение содержания органических веществ и увеличение количества минеральных веществ [134, 135, 150, 160].

Большой вклад в комплексное изучение марала пантов был сделан Сибирским отделением ВНИИ Пантового оленеводства под руководством В.Г. Луницына. Данная группа ученых подтвердила, что с увеличением массы пантов с 1,7 кг до 7,5 кг увеличивается количество аминокислот с 10,91% до 13,88%, с увеличением роста пантов с 2 до 12 лет количество аминокислот снижается с 11,9% до 10,84%. Дальнейшие исследования пантов северного и новозеландского оленей и сибирских маралов данного автора (2008) показали, что максимальное количество аминокислот находится в пантах северного оленя. Основная доля аминокислот приходится на окипролин, аспарагиновую и глутаминовую кислоты, пролин, глицин, аланин, лейцин, аргинин. Марала панты лидируют по содержанию гормонов, факторов роста, макроэлементов и биологической активности. Значительной заслугой В.Г. Луницына является обобщение сведений о химическом составе и биологической активности марала пантов, полученных ранее российскими и зарубежными учеными в монографии [59, 60, 61, 64].

В дальнейшем аминокислотный состав марала пантов достаточно подробно изучался исследователями из разных стран. Согласно многочисленным исследованиям зарубежных авторов, таких как H. Sunwoo et al. (1997, 2000), L. Gu et al.(2007), E. Zha et al. (2012), S. Zhang et al. (2013) с помощью метода ВЭЖХ установлено, что марала панты содержат комплекс БАВ с преобладанием аминокислот [132, 152, 153, 164, 166].

Нуклеиновые кислоты. Впервые О.М. Шампановой с соавт. (1971) показано наличие в пантокрине свободных оснований нуклеиновых кислот (гуанина, гипоксантина, урацила). Методом спектрофотометрии установлено, что содержание азотистых оснований составляет 4,5 мг в 100 мл пантокрин. Данная группа БАВ

представляет интерес, так как является регуляторами метаболизма, оказывают стимулирующее действие на защитные функции организма [102]. С использованием метода ВЭЖХ D. Vi et al. (2016) определены азотистые основания такие, как урацил, цитидин, уридин, гипоксантин, инозин, гуанин, гуанозин, тимидин, аденозин [124, 130].

Обращает на себя внимание тот факт, что основная масса БАВ марала пантов имеет белковую природу и, следовательно, их структура представлена мономерными молекулами – аминокислотами. В связи с чем, представляется целесообразным обобщение сведений об аминокислотном составе марала пантов и их функций в биохимических процессах в организме.

Существует несколько классификаций аминокислот по структурным признакам, такие как: *по взаимному расположению функциональных групп* подразделяют на α -, β -, γ -, где греческая буква при атоме углерода обозначает его удаленность от карбоксильной группы; *по строению бокового радикала* выделяют алифатические (глицин, аланин), ароматические (фенилаланин, тирозин), гетероциклические (пролин, гистидин) и иминокислоты (пролин); *по полярности бокового радикала* выделяют неполярные (аланин, фенилаланин, метионин, пролин), полярные незаряженные (серин), заряженные отрицательно при рН-7 (аспарагиновая и глутаминовая кислоты); полярные заряженные положительно при рН-7 (гистидин, лизин); *по кислотнo-основным свойствам* на основные (лизин, гистидин) и кислые (аспарагиновая и глутаминовая кислоты); *по числу функциональных групп* разделяют на моноаминокарбоновые (глицин), моноаминодикарбоновые (аспарагиновая кислота) и диаминомонокарбоновые (лизин). Особое значение и распространение получила биологическая классификация *на заменимые и незаменимые аминокислоты*. К заменимым относится глицин, пролин, аланин, цистеин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, тирозин, серин, аспарагин, глутамин, а к незаменимым относят валин, лейцин, лизин, изолейцин, треонин, метионин, фенилаланин, триптофан, гистидин, аргинин [4, 28, 109].

Аминокислоты входят в состав структурных компонентов белков, ферментов, гормонов, энзимов, участвуют в азотистом, белковом, липидном и углеводном обмене. Принимает участие в различных биологических процессах организма, в том числе работе центральной нервной системы, мозга, сердечно-сосудистой системы, опорно-двигательного аппарата. Участвуют в синтезе других аминокислот, нуклеиновых кислот и белков (коллагена). Участвуют в процессах регенерации ткани, восстановлении соединительной ткани хрящей, связок, суставов. Недостаток каких-либо аминокислот

приводит к заболеваниям различных органов и систем, нарушению синтеза соединительной ткани, крови, печени и мышц [4, 108, 109].

Липиды. Детальное исследование липидов позволило установить фракционный состав липидной фракции методом ТСХ, преобладающими фракциями которой являются фосфолипиды (лецитин, кефалин), стерины, свободные жирные кислоты. При этом отмечено, что липиды, выделенные из марала пантов («пантовая мука»), «жмыха» и пантокринна качественно идентичны [55, 64, 111].

Отечественными и зарубежными авторами также проведено изучение качественного и количественного состава липидов и жирнокислотного состава общей липидной фракции пантов и пантокринна. Доказано, что липидная фракция представлена фосфолипидами, стеринами, свободными жирными кислотами и триглицеридами [64, 111, 137].

Дальнейшие исследования липидов в пантах и во вторичной пантовой продукции были продолжены Н.Ф. Иванкиной с соавт. (1990). В результате которых установлен более широкий спектр жирных кислот (от C₁₂ до C₂₆) на разных стадиях роста панта марала по сравнению с более ранними исследованиями. В данных работах впервые обнаружены ряд фосфолипидов, гликолипиды, подтверждены иммунохимические свойства последних и участие в иммунном ответе организма. Проведенные исследования подтвердили, что панты на ранних стадиях развития характеризуются более высоким содержанием липидов, особенно фосфолипидов (22,4%), что свидетельствовало об их активном участии в росте панта [15, 36, 37, 40].

Гормоны. В 90-е годы 20 столетия впервые в пантах марала установлено наличие простагландинов группы А, В, Е, F пантов, с которыми в настоящее время многие авторы связывают влияние на репродуктивную функцию марала пантов. Изучение роли простагландинов придавали особое значение С.В. Исай с соавт. (1941) и зарубежные ученые Z. Zang et all (2016) в связи с тем, что простагландины как клеточные биорегуляторы или тканевые гормоны влияют практически на все органы и ткани, обладают гипотензивным свойством. Для установления наличия и определения активности выделенных из марала пантов простагландинов группы А, Е, F использовали метод биотестирования по воздействию экстрактов из пантов на изолированные органы животных, которые вызывали сокращение гладкой мускулатуры [94].

Анализ данных литературы показывает, что большое внимание также уделялось изучению влияния гормонов на рост марала пантов, дифференцировку тканей, накопление в них БАВ и фармакологическую активность. Наличие гормонов стероидной

природы: эстрогены (эстрадиол, эстрон и эстриол) и андрогены (тестостерон и андростерон) были отмечены в ранних работах С.М. Павленко с соавт. (1975). Одновременно изучением данного вопроса занимались В.Г. Луницын (2008), китайские ученые Н. Sunwoo et al. (2000), L. Zhao et al. (2009). Показано, что гормоны служат медиаторами метаболических процессов в тканях, органах, регулируют размножение, рост и развитие организма марала, влияют на дифференцирование тканей, формирование функций для поддержания гомеостаза, участвуют в адаптационных процессах и др. [59, 90, 100, 152, 167].

Более поздние исследования В.Г. Луницына с соав. (2007) позволили выделить гормоны в отдельную группу БАВ, влияющую на регенерацию и рост марала пантов. Отмечено, что их содержание варьирует в зависимости от вида оленя. В работах Z. Zang et al. (2016) подтверждено влияние изменения концентрации тестостерона на рост и развитие пантов. Определение гормонов в плазме проводилось с помощью иммуноферментного анализа [59, 163].

В последние годы особое внимание зарубежными учеными уделяется способности марала пантов к регенерации и поиску БАВ, ответственных за данный процесс. Несмотря на уникальность марала пантов, механизмы регуляции регенерации рогов являются малоизученными. J. Price, S. Allen (2004) отмечают важную роль паратиреоидного гормона и ретиноевой кислоты, которые регулируют дифференцировку хондроцитов, остеобластов и остеокластов. Блокада комплекса ретиноевой кислоты и паратиреоидного гормона может изменить клеточную дифференцировку в естественных условиях. Механизмом, который регулирует экспрессию этих сигналов, скорее всего, является изменением уровней половых стероидов. Наиболее важным гормоном в данном процессе является тестостерон. Дальнейший рост задерживается под действием экзогенного эстрогена, который подавляет пролиферацию тканей [123].

Факторы роста. Выявлено, что панты – сложный орган из быстрорастущей кожи, эмбриональной, хрящевой и костной ткани, что предопределяет наличие в них не только гормонов, но и факторов роста. Факторы роста являются регуляторными пептидами, вырабатываются в клетках различных типов, стимулируют рост дермальных фибробластов и ускоряют регенеративный процесс, стимулируют и ускоряют восстановление кожных ран [59, 125, 126, 129, 147].

При исследовании растущей ткани рога были идентифицированы стимулирующие факторы роста, такие как инсулиноподобный фактор роста-I (IGF-I),

инсулиноподобный фактор роста II (IGF-II), трансформирующий фактор роста роста- β (TGF- β) и эпидермальный фактор роста (EGF). Наличие факторов роста и участие их в росте хрящевой ткани панты было исследовано и подтверждено учеными Канады (S. Naigh (2000)), России (В.Г. Луницын (2007)), Китая (L. Gu et al. (2008)), Кореи (Z. Yang et al. (2012)) [59, 132, 161, 162]

Витамины. Кроме вышеперечисленных соединений в химическом составе БАВ марала пантов С.М. Павленко (1975) выявлены витамины. Наибольшее количество работ, посвященных изучению витаминного состава, принадлежит В.Г. Луницыну с соавт. Выделены витамины А (ретинол), Е (токоферол), витамины группы В (В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₁₂), витамин РР. Отмечено, что верхушка пантов превосходит по содержанию витаминов середину и комель панта [59, 64, 90, 135, 142].

Суммируя вышеизложенные данные, можно сделать заключение, что в настоящее время, в марала пантах установлено наличие разнообразного комплекса биологически-активных соединений. Выделены основные группы БАВ, таких как: аминокислоты, липиды, минеральные вещества, нуклеиновые кислоты, факторы роста, гормоны, витамины. Учитывая тот факт, что панты представляют собой большей частью костно-хрящевую ткань, пронизанную множеством кровеносных сосудов, что дает возможность говорить об однородности их химического состава. Этим, по-видимому, объясняется фармакологическая ценность пантов и широкий спектр лечебного действия препаратов на их основе.

Таким образом, результаты исследований отечественных и зарубежных ученых убедительно доказывают, что марала панты содержат сложный комплекс биологически активных соединений с разнообразной биологической активностью. При этом одной из обширных групп БАВ, выполняющих многообразные функции в организме марала являются аминокислоты.

1.5. Данные народной медицины и фармакологическая изученность марала пантов

На протяжении нескольких столетий марала панты широко использовались для лечения разнообразных заболеваний в странах Восточной и Юго-Восточной Азии. В традиционной медицине Китая, Кореи и Японии панты применялись как нативное, высушенное сырье в измельченном виде или в смеси с другими препаратами животного, а также растительного происхождения. Лечебный эффект охватывал широкий круг болезней разных органов. Прежде всего, целебные средства на основе марала пантов применялись как средства для укрепления здоровья и долголетия [52, 60, 80, 91]

На Востоке марала панты использовали для лечения малокровия, переутомления, ослабления тонуса организма после перенесенных заболеваний, для повышения половой функции, при недостаточности деятельности сердца и сосудистого аппарата, для ускорения заживления инфицированных ран [110, 113, 115].

В восточной медицине в лечебных целях наряду с пантами марала, используют второстепенную пантовую продукцию. Данная продукция в свою очередь делится на мясную и побочную (половые органы самцов, хвосты, сухожилия, зародыши). Вышеперечисленное сырье находит применение в медицине для производства субстанций и препаратов на их основе в странах Юго-Восточной Азии [48, 57, 65, 121].

Самые ранние сведения о применении марала пантов в научной медицине относятся к 1596 г, когда врачом Ли Ши-Чженем была составлена Китайская сводная фармакопея. В данной фармакопее специальный раздел посвящался неокостеневшим и окостеневшим рогам и крови пантовых оленей. В старинных прописях были описаны способы сушки пантов и рецепты целебных средств на их основе. По утверждению китайских врачей, вся сила пантов заключается в крови, содержащейся в них. Эту гипотезу подтвердил ряд тибетских ученых, которые утверждали, что с разрушением элементов крови внутри панты происходит снижение биологической активности получаемых из них препаратов [107, 120, 133].

В России первые фармакологические исследования пантов были проведены врачами А.Л. Тимофеевским, А.П. Масленниковым, А.П. Преображенский (1924). Комплексное и всестороннее изучение пантов как лекарственного сырья были начаты в 30-х годах 20 века под руководством С.М. Павленко. По результатам исследования разработан и зарегистрирован лекарственный препарат «Пантокрин» в форме экстракта и таблеток [90, 99, 106].

Все работы, которые проводились в этот период, не потеряли значения и в настоящее время. В результате этих исследований проведенных под руководством С.М. Павленко было установлено, что пантокрин повышает тонус и двигательную функцию желудка и кишечника, улучшает функцию периферического нервно-мышечного аппарата, а также обмен веществ, что способствует снятию утомления и повышает работоспособность. Отмечено его влияние на сердечно-сосудистую систему и способность активизировать регенеративные процессы при заживлении ран и язв. В ряде экспериментальных работ Э.Е. Зейденшнуром (1936) выявлено влияние пантокрина на белковый и углеводный обмен веществ. [18, 34, 90].

В настоящее время наиболее значимыми и хорошо изученными видами активности пантокрин, марала пантов измельченных (МПИ) и различных извлечений из данного вида сырья являются общетонизирующая и стимулирующая, адаптогенная, а также кратковременный гипотензивный и гонадотропные эффекты [6, 7, 9, 50].

Определение общетонизирующей активности марала пантов измельченных по данным литературы проводили различные авторы. И.И. Брехман, М.А. Гриневич (1966) одними из первых осуществили определение вышеуказанной активности на аппарате «Бесконечный канат» по продолжительности работы мышей до полного утомления. Результаты проведенных исследований показали, что в условиях введения жидкого экстракта пантов пятнистого оленя увеличивается работоспособность мышей как после однократного, так и в результате длительного введения препарата. Авторы отмечают, что полученные данные свидетельствуют о тонизирующей активности пантов [7, 13, 46, 101].

П.А. Луниным, И.А. Муравьевым (1989) проведены исследования по выбору способа оценки биологической активности пантокрин по стимулирующему действию различными методами (плавание мышей, удержание мышей на стержне, бег мышей по бесконечной ленте и лазание по бесконечному канатику). Результаты оценивали по увеличению работоспособности мышей. Было выявлено, что все перечисленные способы не позволяют количественно определить совершенную работу, и требуют использование животных с одинаковой массой для получения сравнимых результатов. Данными авторами был разработан способ определения работоспособности мышей при беге по наклонной плоскости, который позволил получить данные с более достоверными результатами [55, 56, 101].

Адаптогенную активность водного экстракта из пантов И.И. Брехман с соавт. (1963) оценивали по увеличению сопротивляемости организма к вредному воздействию различных факторов физической (тепло, перегрузки, холод), химической (стрихнин, этиловый спирт) и биологической (бактерия Флекснера, стафилококк) природы. Отмечено, что после однократного и многократного введения пантокрин повышает неспецифическую сопротивляемость животных к воздействию вышеуказанных факторов, так, продолжительность пребывания при низкой температуре увеличилась на 12,2%, пятидневный прием повысил этот показатель на 29,6% [6, 7, 33, 50, 103].

Кроме вышеуказанных исследований И.И. Брехман с соавт. (1968г.) провели изучение влияния пантов на течение реакции напряжения (стресс). При этом дополнительно установлено, что пантокрин обладает выраженным антистрессовым

действием, что окончательно позволило включить пантокрин в группу адаптогенов [7, 44, 50].

Гипотензивный эффект пантокрина подтверждается исследованиями Н.М. Киданова, В.Е. Размахина (1971г.). Внутривенное введение пантокрина в яремную вену кроликам приводило к повышению концентрации ацетилхолина в крови и ослаблению тонуса гладких мышц сосудистой стенки, в результате чего наблюдалось снижение артериального давления. Данный эффект был также исследован с использованием пантового порошка, полученного из спиртового экстракта. В результате отмечалось значимое снижение системного артериального давления по сравнению с исходным уровнем на 25,8% - 30,3%. Гипотензивное действие положено в основу определения подлинности пантокрина [43, 64, 90].

Исследования ряда авторов указывают на наличие *гонадотропного действия* у пантокрина. В опытах на крысах установлено, что пантокрин задерживает атрофию и восстанавливает секрецию семенных пузырьков предстательной железы у крыс. Гонадотропное действие пантокрина также было изучено рядом зарубежных ученых различных стран таких как, Великобритании (J. Price, S. Allen (2004)), Южная Корея (E. Zang (2016)) [142, 163, 169, 171].

Определение острой и хронической токсичности пантокрина показало, что токсичность незначительна ($LD_{50}=14,5\pm 0,021\text{г/кг}$ $p<0,05$), и мышами легко переносятся значительные дозы пантов при продолжительном приеме (5 г/кг, 30 дней) [6, 7, 165].

Дальнейшее клиническое изучение пантокрина подтвердило его ценность как активного и безопасного лекарственного средства. При этом доказано, что пантокрин обладает стимулирующей и тонизирующей активностью, оказывает влияние на артериальное давление, обмен веществ и нервную систему, способствует заживлению ран после травм [10, 11, 14, 34, 145].

Таким образом, марала панты и препараты на его основе с фармакологической точки зрения достаточно хорошо изучены. В экспериментах на животных и клинике выявлены такие виды активности, как общетонизирующая, адаптогенная, антистрессорная и гонадотропная.

1.6. Препараты на основе марала пантов и их применение в медицине

Приоритет в изобретении метода изготовления первого лекарственного препарата из пантов, названного «Пантокрин», принадлежит С.М. Павленко (1969). Позже различными авторами были получены новые препараты и пищевые добавки на основе

пантовых оленей таких как: «Рантарин» (И.И. Брехман, 1971) и «Велкорнин» (В.Г. Шелепов, Н.С. Осинцев, 1991). В настоящее время в государственном реестре ЛС РФ 2018 г. в качестве средства общетонизирующего действия зарегистрирован только один лекарственный препарат «Пантокрин» на основе пантов благородного оленя, в виде экстракта для приема внутрь и таблеток [25].

В настоящее время подлинность «Пантокрин» определяется по наличию группы БАВ - аминокислотам, при этом используются устаревшие методы анализа - ТСХ. Для количественного определения активности препарата "Пантокрин" в соответствии с требованиями фармакопейной статьи ФС 42-2323-85 используется биологический метод. Биологическая активность проверяется по снижению артериального давления у наркотизированных кроликов после внутривенного введения пантокрин. Препарат считают активным, если испытуемый раствор пантокрин вызывает снижение артериального давления у трех животных из пяти для препаратов из марала пантов не менее чем на 25% от исходного уровня, а для препаратов из пантов пятнистого оленя - не менее чем на 30%. Количественное определение проводят биологическим методом, по способности снижать артериальное давление у кроликов [90, 99].

Предложен способ количественного определения биологической активности экстракта пантов по степени ингибирования холинэстеразы. Авторы впервые биохимическим методом экспериментально установили факт ингибирования холинэстеразы веществами, содержащимися в экстракте пантов, опираясь на холинергические процессы, протекающие при проведении биологических тестов на кроликах [92].

Пантокрин применяют как адаптогенное средство, с целью повышения способности организма переносить физические и психоэмоциональные нагрузки, для восстановления функции саморегуляции и повышения иммунитета после перенесенных травм и их последствий, для восстановления либидо у мужчин и женщин, для повышения тонуса сердечно-сосудистой системы и др. [86, 90, 103, 104].

Следует отметить, что спектр выпускаемой продукции на основе марала пантов данными предприятиями с каждым годом увеличивается и, несомненно, это является результатом повышающегося спроса на данную продукцию, как на территории РФ, так и за рубежом. Переработкой основной части пантов в России занимается ряд предприятий, таких как ЗАО «ВИФИТЕХ», ОАО «Фармастандарт-Томскхимфарм», которые производят из пантов лекарственное средство – «Пантокрин». Основными

производителями пантовой продукции в Алтайском крае и республике Алтай являются ЗАО «Алтайвитамины», ЗАО «Эвалар» и др. [25].

В последние годы коммерческими фирмами предложен широкий ассортимент пищевых и биологически активных добавок (БАД) на основе марала пантов измельченных, что вызвано значительным упрощением процесса производства и исключением из состава готового продукта этилового спирта. Кроме того, производители полагают, что преимуществом использования измельченного сырья является наличие всего нативного комплекса БАВ, в том числе аминокислот, пептидов, гормонов, витаминов и других соединений. В большинстве случаев, вышеуказанные БАД выпускаются для применения внутрь в виде капсул, пантовых слайсов, бальзамов [47, 79, 98].

Выявлено, что диапазон использования пантового порошка значительно увеличивается за счет возможности его наружного применения в чистом виде или в смеси с измельченным лекарственным растительным сырьем, которые рекомендуются как профилактические средства. Ассортимент средств для наружного применения представлен следующими наименованиями: пантовые ванны, компрессы, микроклизмы с отваром пантового концентрата, свечи. При этом наблюдается непосредственное воздействие биологически активных веществ на кожу и слизистые поверхности [9, 10, 11, 29, 170].

В настоящее время БАД из марала пантов используется в различных направлениях, прежде всего, восстановительном лечении и курортологии как тонизирующее средство при умственной и физической усталости, при астенических состояниях, неврозах и восстановлении организма после перенесенных травм, при снижении либидо у мужчин, эректильной дисфункции [29, 49, 103, 154, 155].

Таким образом, в настоящее время зарегистрирован только один лекарственный препарат «Пантокрин» на основе марала пантов, в качестве общетонизирующего средства, но при этом, с указанным видом сырья выпускается большое количество БАД, наибольший интерес из которых представляют марала панты измельченные, которые содержат нативный комплекс БАВ и поэтому широко используются в восстановительном лечении и курортологии. При этом анализ продукции фирм, выпускающих капсулированные формы с марала пантами измельченными, свидетельствуют о том, что в настоящее время нет единого мнения по выбору оптимальной дозы, их условиям хранения, срокам годности и способу применения.

Выводы по главе

1. Марал является значимым видом животных для отрасли Алтайского края, т.к. является основным источником пантовой продукции. Особую ценность представляют панты - молодые, неокостеневшие рога марала. Традиционно марала панты широко используют в странах Юго-Восточной Азии, а с конца 20 века мараловодство как отрасль появилась в России. Большая сырьевая база, стабильный спрос и высокая рентабельность марала пантов сделали их традиционной экспортной составляющей во внешнеэкономической деятельности Алтая и сырьем для получения разнообразной продукции на основе марала пантов измельченных.

2. Марала панты содержат сложный комплекс биологически активных соединений с разнообразной биологической активностью, таких как: аминокислоты, липиды, нуклеиновые кислоты, гормоны, факторы роста и витамины. Обращает на себя внимание тот факт, что основная масса биологически активных веществ марала пантов имеет белковую природу и, следовательно, их структура представлена аминокислотами, которые выполняют многообразные функции в организме марала.

3. Марала панты и препараты на его основе с фармакологической точки зрения достаточно хорошо изучены. В экспериментах на животных и клинике выявлены такие виды активности, как общетонизирующая, адаптогенная, антистрессорная и гонадотропная. В настоящее время зарегистрирован только один лекарственный препарат «Пантокрин» на основе марала пантов в качестве общетонизирующего средства, но при этом с указанным видом сырья выпускается большое количество БАД, широко используемых в восстановительном лечении и курортологии.

4. Российские производители в последние годы активно используют марала панты измельченные для дальнейшей переработки. В настоящее время существуют различные способы переработки сырья при получении марала пантов измельченных. Одним из основных различий применяемых технологий является отсутствие или наличие в технологическом процессе стадии «удаление кожного покрова». В связи с отсутствием единого подхода к данному вопросу требуется проведение исследований по экспериментальному обоснованию необходимости удаления кожного покрова, выбору оптимальной измельченности и способа обеспечения микробиологической чистоты готового продукта.

5. В настоящее время качество препаратов на основе марала пантов измельченных определяется с использованием устаревших методов анализа. При этом ни биологическая активность, ни содержание основных групп БАВ в сырье и

выпускаемой продукции не определяется, кроме того, нет единого мнения по выбору оптимальной дозы, их условиям хранения, срокам годности и способу применения. Вышеизложенное свидетельствует о необходимости проведения комплекса исследований, направленных на решение данных вопросов.

ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Выбор объекта исследования

Выбор объекта исследования был обусловлен тем, что марала панты являются значимым сырьем для отрасли Алтайского края и основным источником для получения пантовой продукции, реализуемой на внутреннем рынке нашей страны и крупной экспортной составляющей во внешнеэкономической деятельности края.

Значительным аргументом в пользу выбора объекта явился тот факт, что марала панты содержат уникальный комплекс БАВ, обуславливающих их многогранную фармакологическую активность (раздел 1.5). В связи с этим, ассортимент производимой продукции на основе измельченных марала пантов в Алтайском крае с каждым годом увеличивается. Наряду с вышеизложенным в настоящее время качество сырья и готовой продукции определяется только по товароведческим показателям (внешний вид, цвет, содержание влаги и золы) и категории сырья. При этом не учитывается биологическая активность и количественное содержание основных БАВ [24]. Обращает на себя тот факт, что в настоящее время нет единого мнения по выбору оптимальной дозы, условиям хранения, срокам годности и способу применения продукции на основе марала пантов.

При выборе объекта исследования также учитывали данные литературы (раздел 1.3) о том, что в настоящее время существуют различные способы переработки сырья при получении марала пантов измельченных. Одним из основных различий применяемых технологий является отсутствие или наличие в технологическом процессе стадии «удаление кожного покрова». Каждая из применяемых технологий имеет свои преимущества и недостатки. Очевидно, что технология «без удаления кожного покрова» для производителей является более привлекательной с коммерческой точки зрения, так как удаление кожного покрова достаточно трудоемкий процесс, требующий дополнительных затрат. При этом наличие измельченного волосяного покрова является также очевидным недостатком, ухудшающим не только товарный вид готовой продукции, но и, как было установлено в наших предварительных экспериментах, микробиологические показатели данного вида сырья.

На основании вышеизложенных данных в качестве объекта исследования были выбраны 5 серий марала пантов (*Antlers Cervus elaphus sibiricus*), с удаленным кожным покровом 1-2 категории, заготовленные «Внешнеэкономической производственно-отраслевой ассоциацией оленеводческих хозяйств Республики Алтай» при министерстве

сельского хозяйства Республики Алтай. Срезка пантов у маралов-рогачей осуществлялась во время плановой срезки (май-июнь 2013-2016 г), затем панты консервировали по традиционной технологии (раздел 1.3).

Вспомогательные вещества.

В ходе разработки технологии капсулированных лекарственных форм на основе марала пантов измельченных в качестве вспомогательных веществ использовали вещества, разрешенные к медицинскому применению в Российской Федерации и отвечающие требованиям соответствующей нормативной документации:

лудипресс (лактоза, Kollidon 30 и Kollidon CL) – НД 42-8803-05 (BASF, Германия);

крахмал растворимый – ГОСТ 10163-76 («Вектон», Россия).

2.2. Методы исследования, используемые при изучении качественного состава биологически активных веществ

При анализе качественного состава аминокислот МПИ использовали качественные реакции и современный метод анализа – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

1. В основу пробоподготовки МПИ для ВЭЖХ анализа была положена методика определения аминокислот, которая была адаптирована нами к исследуемому виду сырья. С целью экономии времени и расхода элюентов была уменьшена длина колонки и соответственно подобран градиент элюирования [46].

а) Для изучения аминокислотного состава марала пантов измельченных использовали гидролизат, полученный в результате кислотного гидролиза с использованием хлористоводородной кислоты раствора 6 моль/дм³ при 110°С в течение 17 ч.

б) Пробоподготовка объекта исследования заключалась в расщеплении пептидных связей белка в ходе кислотного гидролиза с последующей модификацией аминокислот раствором фенилизотионата (ФИТЦ) и проходила в 3 этапа.

1 этап - приготовление реактивов.

Раствор хлористоводородной кислоты 6 моль/дм³: в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 500 см³ помещали 250 см³ бидистиллированной воды и добавляли 250 см³ хлористоводородной кислоты концентрированной, раствор перемешивали.

Раствор фенилизотионата в изопропанол: в виалу помещали 0,2 см³ фенилизотионата и 7 см³ изопропанола, тщательно перемешивали.

Раствор натрия гидрокарбоната 0,1 моль/дм³ готовили следующим образом: в мерную колбу вместимостью 10 дм³ вносили 0,106 мг (т.н.) натрия углекислого, добавляли до метки воды бидистиллированной, тщательно перемешивали.

II этап - гидролиз проб: 0,1 г (т.н.) измельченных марала пантов помещали в вials и добавляли 10 см³ хлористоводородной кислоты 6 моль/дм³. Помещали в термостат при 110 °С и выдерживали в течение 17 часов.

III этап - модификация аминокислот фенилизотиоционатом. После охлаждения гидролизаты фильтровали через бумажный фильтр («Синяя лента», ООО «Бавер», диаметр фильтра 125 мм), аликвоту 0,1 см³ помещали в пробирку вместимостью 5 см³, и высушивали под вакуумом в токе воздуха, поступающем через капилляр при разряжении, создаваемом водоструйным насосом при 60 °С создаваемой водяной баней. К высушенной аликвоте добавляли 0,10 см³ натрия гидрокарбоната раствор 0,15 моль/дм³, тщательно перемешивали, затем добавляли 0,35 см³ раствора фенилизотиоционата в изопропанол и 0,05 см³ воды бидистиллированной. При наличии мути раствор прогревали на водяной бане при 60 °С 10-15 с до просветления. Полученный раствор выдерживали 20 мин при комнатной температуре и, после чего, сразу высушивали в аналогичных условиях в течение 10 мин. Сухой остаток растворяли в 1 мл воды бидистиллированной центрифугировали (центрифуга ОПн 8УХЛ4.2) 10 мин при 10 000 об/мин.

в) ВЭЖХ-анализ проводили с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа марки LC-20 фирмы «SHIMADZU» (Япония) с УФ-детектором, с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с использованием программы «LCsolution version 1.4». Неподвижная фаза – хроматографическая колонка PerfectChrom 100 C-18 («MZ-Analysentechnik», Германия), 150×4,6 мм, размер частиц сорбента 5 нм с предколонкой Orbit 100 C-18 (2,6×4,6 мм размер частиц сорбента 5 нм). Подвижная фаза – А: ацетатный буфер 0,06 моль/дм³ (рН=5,5); В: ацетонитрил + 1% изопропилового спирта; С: ацетатный буфер 0,06 моль/дм³ (рН=4,05). Скорость подачи элюента – 130 мкл/мин, объем пробы – 20 мкл, длина волны детектирования 254 нм, градиентное элюирование (табл. 2.1).

Таблица 2.1

Условия хроматографического разделения аминокислот

Время, мин	Объемная доля компонента, %		
	А	В	С
1	2	3	4

Таблица 2.1(продолжение)

1	2	3	4
0,01	96	4	0
10	37	11	52
13	88,5	11,5	0
21	80	20	0
22	58	22	20
24	0	24	76
32	0	33,5	66,5
32,01	20	80	0
35,3	20	80	0
35,31	97	3	0
41,3	97	3	0

г) Для приготовления элюентов использовали ацетонитрил для хроматографии «Сорт 0» («Криохром», Россия), натрий уксуснокислый 3-водный «ч.д.а» («ВЕКТОН») и воду очищенную, полученную на установке для получения воды аналитического качества «УПВА-5».

2. Идентификацию веществ осуществляли по временам удерживания в сравнении со стандартными образцами (СО) аминокислот: глицин, пролин, оксипролин, аргинин, лизин, лейцин, треонин, валин, аспарагин, глутамин, фенилаланин, серин, гистидин, аланин, тирозин, изолейцин («Sigma», Германия).

3. Все приведенные значения величин времени удерживания, спектральных отношений являются средними величинами 5 повторных измерений, при этом отклонения полученных результатов не превышают 0,5%.

2.3. Методы исследования количественного содержания аминокислот в марала пантах измельченных

Для количественного определения аминокислот в МПИ был использован современный метод анализ – ВЭЖХ [46, 114].

В основу количественного определения была положена методика качественного анализа, т.к. обеспечивала хорошее разделение пиков (раздел 2.2).

Расчет содержания основных аминокислот марала пантов (глицин, аланин, пролин), проводили с использованием метода абсолютной градуировки, при котором определялась зависимость между количеством введенного раствора аминокислот в различных концентрациях и площадью пиков на хроматограмме.

Расчеты проводили по формуле:

$$X = \frac{C \times V_1 \times V_3}{V_2 \times m} \times 100\%$$

, где

C – массовая концентрация аминокислоты, полученная по градуировочной характеристике, мг/см³;

V_1 – объем воды, используемый для растворения сухих проб после модификации, см³;

V_2 – объем аликвоты гидролизата пробы, взятой для модификации, см³;

V_3 – объем хлористоводородной кислоты 6 моль/дм³, добавляемой для гидролиза пробы, см³;

m – навеска сырья, взятая для гидролиза, мг.

2.4. Методы исследования физико-химических, технологических свойств материалов и оценки качества экспериментальной лекарственной формы

1. Описание (внешний вид, цвет и запах) МПИ и капсул на их основе определяли согласно ГФ XIII изд., Том 1, ОФС 1.1.0001.15 «Правила пользования фармакопейными статьями».

2. Потерю в массе при высушивании (X , %) МПИ определяли стандартным методом по методике ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» высушиванием навески в предварительно высушенных до постоянной массы и взвешенных бюксах в сушильном шкафу при температуре 100-105°C в течение 2 часов [26].

3. Зола общую (X , %) МПИ определяли по методике ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая» [26].

4. Гигроскопичность (способность поглощать влагу) оценивали по методике определения потери в массе при высушивании ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» после выдерживания бюкса с навеской в камере с относительной влажностью воздуха 100% в течение 24 часов.

5. Сыпучесть МПИ определяли стандартным методом по методике ГФ XIII изд., Том 2, ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» по наиболее распространенным характеристикам: степени сыпучести (скорости протекания порошка через отверстие), угол естественного откоса и насыпной объем [27].

а) Методика определения сыпучести заключается в определении времени, в течение которого определенная навеска испытуемого материала, взятая с точностью $\pm 0,5$ %, проходит (протекает) через отверстие сухой воронки определенного размера. Степень сыпучести определяли с помощью прибора ВП-12А с диаметром выпускаемого

отверстия 12 мм. Сыпучесть выражали в секундах с точностью до 0,1 с, отнесенных к 100 г образца [27].

б) Угол естественного откоса – это постоянный, трехмерный угол (относительно горизонтальной поверхности), сформированный конусообразной пирамидкой материала, полученной в определенных условиях эксперимента. Определение проводили по методике определения сыпучести с использованием с помощью того же оборудования и тех же условиях. При интерпретации результатов экспериментов учитывали то, что степень сыпучести является очень хорошей при угле откоса от 25 до 30°, хорошей от 31 до 35°, удовлетворительной от 36 до 45°, неудовлетворительной от 46 до 55°, плохой от 56 до 65°, очень плохой при более 66° [27].

в) Определение насыпного объема позволяет определить при заданных условиях насыпные объемы до и после уплотнения, способность к уплотнению и насыпную плотность МПИ [27]. Определяли на устройстве для вибрационного уплотнения порошков 545Р–АК–3 по стандартной методике ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков». Полученные данные использовали для расчета насыпной плотности, отношения Хауснера и индекса Карра [25].

По значению насыпной плотности определяли степень сыпучести порошка, при этом отношение Хауснера и индекс Карра рассчитывали по следующим формулам:

$$\text{Индекс Хауснера: } H = \frac{P_{\text{уплот}}}{P_{\text{своб}}}$$

$$\text{Индекс Карра: } I = 100 * \frac{P_{\text{уплот}} - P_{\text{своб}}}{P_{\text{уплот}}}$$

где, $P_{\text{уплот}}$ – насыпная плотность вибрационная

$P_{\text{своб}}$ – насыпная плотность свободная

6. Размер частиц (фракционный состав) изучаемого сырья определяли ситовым анализом с помощью стандартного набора сит (диаметр отверстий 2,0, 1,0, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 и 0,1 мм) по методике ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.1.0015.15 «Ситовой анализ» [26].

7. Среднюю массу и однородность массы капсул согласно ГФ XIII изд., Том 2, ОФС.1.4.1.005.15 «Капсулы» определяли по методике ГФ XIII изд., Том 2, ОФС.1.4.2.009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм». В процессе изучения данного показателя определяли среднюю массу, отклонения массы каждой капсулы и отклонения массы содержимого каждой капсулы [27].

8. Распадаемость капсул определяли согласно требованиям ГФ XIII изд., Том 2, ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул» на лабораторном идентификаторе процесса – приборе 545 Р-АК-1 «Качающаяся корзинка» [27].

9. Оценку качества капсул по тесту «Растворение» проводили согласно ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» с использованием прибора для растворения лекарственных веществ из таблеток и капсул АК 7 М-00-00 ПС («Вращающаяся корзинка»). При испытании корзинка вращалась в среде растворителя (растворитель – хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М, объем – 900 мл) со скоростью 100 об/мин. В процессе определения с помощью термостата поддерживали температуру 37° С. Через 45 минут отбирали пробу раствора, фильтровали и в фильтрате проводили количественное определение аминокислот с использованием валидированной нами методики ВЭЖХ (раздел 3.1.2).

10. Микробиологическую чистоту МПИ и капсул на их основе определяли по методикам ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» на базе Барнаульского филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту» [26].

11. Изучение влияния способов дополнительной обработки на микробиологическую чистоту МПИ проводили с помощью таких методов как:

а) *термическая обработка* (электрошкаф СНОЛ – 3,5.3,5.3,5/3,5 – И1М, 60°С, 240 мин);

б) *УФ – излучение* (облучатель хроматографический УФС 254/365, длина волны 254 нм, 180 мин и 360 мин);

в) *СВЧ – излучение* (микроволновая печь DAEWOO модель KOR - 6L15, 700 Вт, 0,7 мин);

г) *ионизирующее излучение* (импульсный линейный ускоритель ИЛУ – 10, Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН г. Новосибирск) в условиях, рекомендуемых для обработки лекарственного сырья согласно ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.1.0016.15 «Стерилизация» (доза поглощения 10 кГр). Данный метод относится к радиационным методам стерилизации, при котором осуществляется обработке продукта ионизирующим излучением. Мониторинг поглощенного продуктом излучения осуществляется при помощи дозиметрических методов ежегодно ФГУП «Всероссийским научно-исследовательским институтом физико-технических и радиотехнических измерений» (ВНИИФТРИ);

д) обработка спиртом этиловым 70% и 90% (5-10 мин) и сушка полученной массы (вакуум - сушильном шкафу ШСВ-45, при температуре 40-50 °С, 30 мин).

12. Изучение стабильности проводили в естественных условиях и в условиях стресс-испытаний.

а) В естественных условиях образцы хранились согласно ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств» в защищенном от света месте при температуре 15-25 С° и относительной влажности не более 60±5% [26].

б) В условиях стресс-испытаний образцы подвергали воздействию таких факторов как: естественный солнечный свет; искусственный свет (линейная люминесцентная лампа Т8F18W/54-765 (54-765), мощность 18W); УФ - излучении (254 нм). Исследования проводили при относительной влажности воздуха 60 ± 5 % и температуре 15-25 °С. Дополнительно изучалось влияние повышенной температуры (70°С) при выдерживании сырья в сушильном шкафу марки СНОЛ – 3,5.3,5.3,5/3,5 – И1М [26].

13. Измельчение марала пантов проводили на кормоизмельчителе «Эликор – 1». Мелкое измельчение проводили на шаровой мельнице МШ – 100.

14. Центрифугирование осуществляли на центрифуге ОПн 8УХЛ4.2.

15. Определение содержания радионуклидов цезия – 137 и стронция – 90 проводили в ФГБУ «Центральная научно-производственная ветеринарная радиологическая лаборатория».

2.5. Методы фармакологических исследований

1. Эксперименты *in vivo* проводили на сертифицированных животных обоего пола (крысы линии Wistar массой 180-220г и нелинейных белых мышах массой 20-24 г), предоставленных Институтом цитологии и генетики СО РАН РФ и прошедших 14 - дневный карантин. Содержание экспериментальных животных осуществлялось в стандартных условиях вивария на обычном рационе при свободном доступе к воде и пище в условиях естественного освещения и температуры 20-22°С. Для проведения опытов формировались группы методом выборки из особей, имеющих близкую массу тела, контролируруемую периодическим взвешиванием для коррекции количества вводимых препаратов. В исследование были отобраны животные без признаков отклонений в состоянии здоровья так, чтобы разброс по исходной массе внутри экспериментальной группы не превышал ± 10%.

2. Каждому животному на различные участки тела наносили определенные опознавательные знаки и отображали их в протоколе.

3. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, изложенным в санитарных правилах по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) и в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01 апреля 2016 г. №199н «Об утверждении правил лабораторной практики» [85].

4. Эксперименты проводили при строгом соблюдении требований Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей» (Страсбург, 1986г), приказа МЗ РФ №199 н от 01.04.2016г., «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012) [97]. На исследование получено разрешение Комитета по этике при ФГБОУ ВО Алтайский Государственный Медицинский Университет Минздрава РФ.

5. Изучение острой токсичности марала пантов измельченных осуществляли согласно «Методическим указаниям по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [97].

а) Животные массой 20-24 г были разделены на 6 групп по 10 мышей в каждой. Исследования проводили на трех сериях МПИ в двух дозах 2500 мг/кг и 5000 мг/кг. При выборе доз исходили из максимального количества МПИ, которые максимально возможно ввести экспериментальным животным.

б) Первую серию исследуемой субстанции получала первая группа мышей перорально с пищей (хлебный шарик размером 1 см³, смешанный с исследуемой пробой) однократно в течение суток в дозе 2500 мг/кг; вторая группа мышей – в дозе 5000 мг/кг.

в) Вторую серию исследуемой субстанции получала третья группа мышей перорально с пищей (хлебный шарик размером 1 см³, смешанный с исследуемой пробой) однократно в течение суток в дозе 2500 мг/кг; четвертая группа мышей – в дозе 5000 мг/кг.

г) Третью серию исследуемой субстанции получала пятая группа мышей перорально с пищей (хлебный шарик размером 1 см³, смешанный с исследуемой пробой) однократно в течение суток в дозе 2500 мг/кг; шестая группа мышей – в дозе 5000 мг/кг.

д) Общая продолжительность наблюдения составляла 14 дней. В первый день мыши находились под постоянным наблюдением. Общее состояние животных в течение опыта оценивали с учетом изменения координации движений, поведенческих реакций, дыхательной функции, нервно-мышечной возбудимости, также измеряли массу тела до получения исследуемой субстанции и после окончания наблюдения.

е) Токсическое действие исследуемого препарата оценивали по клинической картине интоксикации и выживаемости животных в течение 14 дней. Массу тела животных регистрировали до введения препарата и на 14 сутки наблюдения.

6. Определение общетонизирующей активности измельченных марала пантов осуществляли согласно «Методике оценки выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов», предложенной Каркищенко В.Н. с соавт. По мнению авторов, данная методика позволит адекватно оценить общетонизирующую активность по уровню выносливости животных [5, 95].

а) В соответствии с задачами исследования животные делились на 3 или 4 группы: 1 – контрольная; 2,3,4 – экспериментальные.

б) Контрольная группа крыс ежедневно получала плацебо в виде хлебного шарика объемом 1 см³, начиная с третьего дня эксперимента. Животные первой, второй и третьей экспериментальных групп получали такие же шарики, смешанные с исследуемыми образцами измельченных марала пантов в дозе 0,2 г один раз в сутки (соответственно сырье 1,2 и 3 серий).

в) Расчет дозы МПИ производился исходя из анализа доз МПИ в БАД выпускаемых в настоящее время и из результатов определения эффективности действия МПИ и с учетом коэффициента перехода от животного к человеку.

$$\text{ЭДЧ} = \frac{\text{Доза крысы} \times \text{Коэффициент крысы}}{\text{Коэффициент человека}}$$

г) В первый день эксперимента крысы всех групп запускались в емкость с водой (емкость 105 л, диаметр 60,0 см, высота 65,0 см) при температуре 27-29°C и грузом 10% от массы тела без получения исследуемых образцов.

д) На 3 и 7 день эксперимента животные помещались в воду аналогичным образом через один час после получения плацебо или исследуемых образцов марала пантов.

е) При наблюдении за животными фиксировалось время их нахождения в воде до момента, когда они начинали тонуть. Этот момент являлся точкой окончания эксперимента.

2.6. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных физико-химических и технологических исследований (P = 95%) проводили при помощи критерия Стьюдента с вычислением

пограничных значений доверительного интервала среднего результата и определением относительной ошибки среднего при различных значениях n (число результатов) по стандартным формулам ГФ XIII изд. с использованием программ Statistica 6.1 и Microsoft Excel [26, 96].

Статистическую обработку результатов фармакологических исследований проводили путем расчета средней (\bar{X}) и стандартной ошибки (m) с использованием непараметрических методов Вилкоксона-Манна-Уитни (U) и точного метода Фишера (ϕ). Различие считали достоверным при $p < 0,05$ [51].

ГЛАВА III. ПОЛУЧЕНИЕ МАРАЛА ПАНТОВ ИЗМЕЛЬЧЕННЫХ ПО ТРАДИЦИОННОЙ ТЕХНОЛОГИИ И ОЦЕНКА ИХ КАЧЕСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ ВАЛИДИРОВАННЫХ МЕТОДИК

Анализ данных литературы свидетельствует о том, что в настоящее время на большинстве предприятий Алтайского края и Республики Алтай для получения марала пантов измельченных используется технология, включающая такие стадии технологического процесса, как консервирование, удаление кожного покрова (на ряде предприятий), сушка и измельчение. В связи с чем, представлялся интерес детального изучения целесообразности использования традиционных стадий и операций получения марала пантов измельченных и установления их соответствия требованиям современной нормативной документации. Основанием для проведения данных исследований явилось то, что в настоящее время качество марала пантов и БАД на основе МПИ контролируется по товароведческим показателям (ГОСТ 4227-76, ТУ), при этом биологическая активность и содержание основных групп БАВ в настоящее время не определяются [24].

3.1. Получение марала пантов измельченных по традиционной технологии

В основу получения марала пантов измельченных по традиционной технологии нами были положены основные стадии перечисленные выше. При этом мы учитывали тот факт, что в настоящее время существуют различные способы переработки сырья при получении марала пантов измельченных. Одним из основных различий применяемых технологий является отсутствие или наличие в технологическом процессе стадии «удаление кожного покрова».

В предварительных исследованиях было выявлено, что кожный покров ухудшает товарный вид сырья и при этом значительно обсеменен разнообразной микрофлорой. Поэтому, несмотря на то, что технология «без удаления кожного покрова» для производителей является более привлекательной с коммерческой точки зрения, так как удаление кожного покрова достаточно трудоемкий процесс, требующий дополнительных затрат, нами было дано предпочтение технологии «с удалением кожного покрова» (раздел 1.3). Выбранные стадии получения марала пантов измельченных, представлены в виде схемы (рис.3.1).

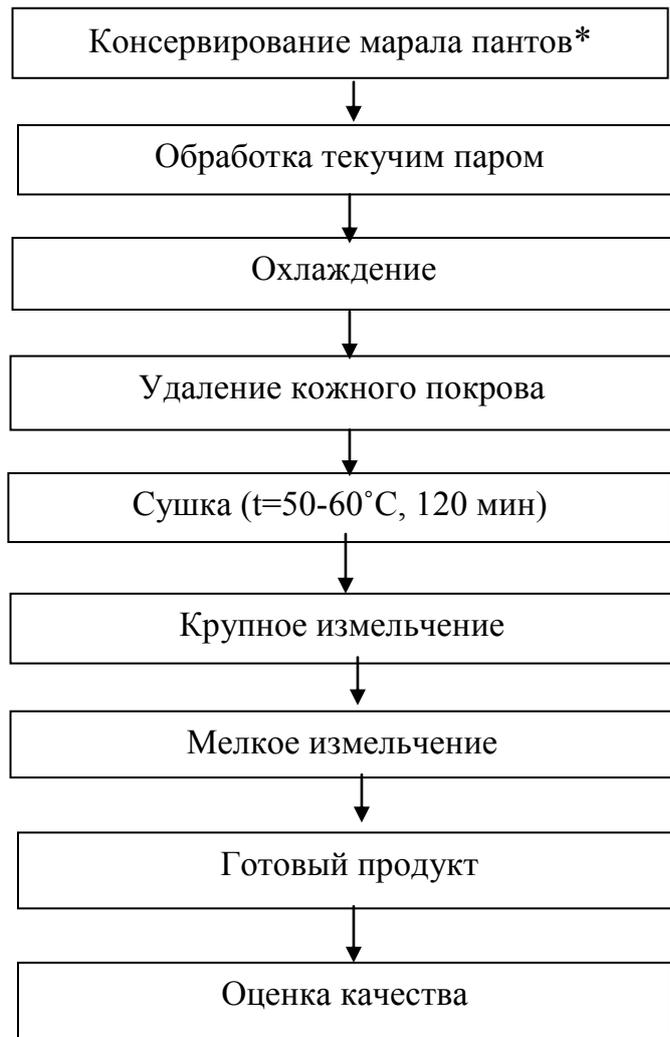


Рис. 3.1. Схема получения марала пантов измельченных
Примечание: *- данная стадия проведена в условиях маральника



Б



В

Рис.3.2. А - марала пант, Б - продольный срез, В – поперечный срез.

Используемая нами технология заключалась в следующем: по 350,0 г марала пантов консервированных по традиционной методике (раздел 1.3) помещали на перфорированную поверхность на водяную баню и обрабатывали текучим паром в

течение 10-15 мин, после чего охлаждали до комнатной температуры 20 мин, затем механическим способом удаляли кожный покров. Панты с удаленным кожным покровом подсушивали в сушильном шкафу марки СНОЛ – 3,5.3,5.3,5/3,5 – И1М при температуре 50-60 °С в течение 120 мин, затем марала панты распиливали ножовкой ручной («Inforce 06-08-07) на куски 1-3 см (рис.3.2). Полученные куски измельчали на кормоизмельчителе «Эликор - 1» (раздел 2.4).

3.2. Выбор показателей качества марала пантов измельченных и методик их определения

Анализ данных литературы свидетельствует, что не все требования к качеству МПИ учитываются при использовании традиционной технологии. Как указывалось выше, качество марала пантов контролируется по товароведческим показателям (ГОСТ 4227-76, ТУ), при этом биологическая активность и содержание основных групп БАВ в настоящее время не определяются. В связи с чем в качестве основных показателей качества МПИ нами были выбраны следующие показатели: описание, потеря в массе при высушивании, зола общая, размер частиц, качественный состав и количественное содержание аминокислот и микробиологическая чистота.

При определении таких показателей, как описание, потеря в массе при высушивании, зола общая, размер частиц и микробиологическая чистота в настоящее время используются стандартные методики ГФ РФ. При этом методик качественного и количественного анализа БАВ в пантах марала измельченных не разработано (раздел 2).

Одной из обширных и стабильных групп БАВ марала пантов являются аминокислоты, с которыми ряд авторов связывают их общетонизирующую активность. Кроме того, основная масса БАВ марала пантов имеет белковую природу и, следовательно, их структура представлена мономерными молекулами – аминокислотами. Вместе с тем анализ качественного и количественного состава аминокислот указанных субстанций проводится достаточно редко и, как правило, с применением устаревших методов анализа (раздел 1.4).

В связи с чем, представляется целесообразным более детальное изучение одной из основных групп БАВ марала пантов измельченных, которыми являются аминокислоты, и выбор методики их определения с помощью современного метода анализа – высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В основу разработки методики качественного и количественного определения аминокислот МПИ была положена методика выполнения измерений массовой доли

аминокислот, предложенной ООО «Внедренческая фирма «АНАЛИТ» (генеральный дистрибьютор Шимадзу). Данная методика основана на расщеплении пептидных связей белка хлористоводородной кислоты раствором с последующей модификацией получаемых аминокислот фенилизотионатом (ФИТЦ) и дальнейшем разделении фенилтиокарбамильных производных аминокислот [46].

С целью экономии времени и расхода элюентов была уменьшена длина колонки и соответственно подобран градиент элюирования. Ниже приведены экспериментальные данные по валидационной оценке методик качественного анализа и количественного определения аминокислот в МПИ.

3.3. Валидационная оценка методик качественного анализа аминокислот марала пантов измельченных

Методика качественного анализа аминокислот заключалась в следующем: 0,1 г (т.н.) марала пантов измельченных помещали в вials, добавляли по 10 см³ хлористоводородной кислоты раствора 6 моль/дм³. Герметично закупоренные вials выдерживали в термостате при 110 °С в течение 17 ч. После охлаждения гидролизат фильтровали через бумажный фильтр («Синяя лента», ООО «Бавер», диаметр фильтра 125 мм) в коническую колбу со шлифом вместимостью 10 см³, затем 0,1 см³ полученного раствора помещали в пробирку со шлифом вместимостью 5 см³ и высушивали под вакуумом в токе воздуха, поступающем через капилляр при разряжении, создаваемом водоструйным насосом при 60 °С создаваемой водяной баней. К высушенной аликвоте добавляли 0,10 см³ натрия гидрокарбоната раствор 0,15 моль/дм³, 0,35 см³ раствора ФИТЦ в изопропанол и 0,05 см³ воды бидистиллированной. При наличии мути раствор прогревали на водяной бане при 60 °С 10-15 с до просветления. Полученный раствор выдерживали 20 мин при комнатной температуре и, после чего, сразу высушивали в аналогичных условиях в течение 10 мин. К сухому остатку добавляли 1 см³ воды бидистиллированной центрифугировали (центрифуга ОПн 8УХЛ4.2) 10 мин при 10 000 об/мин.

Исследования проводили на жидкостном хроматографе LC-20 фирмы «SHIMADZU» (Япония) с УФ-детектором, с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с использованием программы «LCsolution version 1.4». Неподвижная фаза – хроматографическая колонка PerfectChrom 100 C-18 («MZ-Analysentechnik», Германия), 150×4,6 мм, размер частиц сорбента 5 нм с предколонкой Orbit 100 C-18 (2,6×4,6 мм размер частиц сорбента 5 нм). Подвижная фаза – А:

ацетатный буфер 0,06 моль/дм³ (рН=5,5); В: ацетонитрил + 1% изопропилового спирта; С: ацетатный буфер 0,06 моль/дм³ (рН=4,05). Скорость подачи элюента – 130 мкл/мин, объем пробы – 20 мкл, длина волны детектирования 254 нм, градиентное элюирование. В работе использовали стандартные образцы (СО) следующих аминокислот: глицин, аланин, пролин («Sigma», Германия).

Специфичность методики экспериментально устанавливали путем сопоставления результатов анализа образцов, содержащих сопутствующие вещества и стандартных образцов (СО). Хроматограммы элюентов, хроматограмма плацебо, хроматограмма СО и исследуемого раствора представлены ниже (рис.3.3- 3.6).



Рис.3.3 . Хроматограмма элюентов

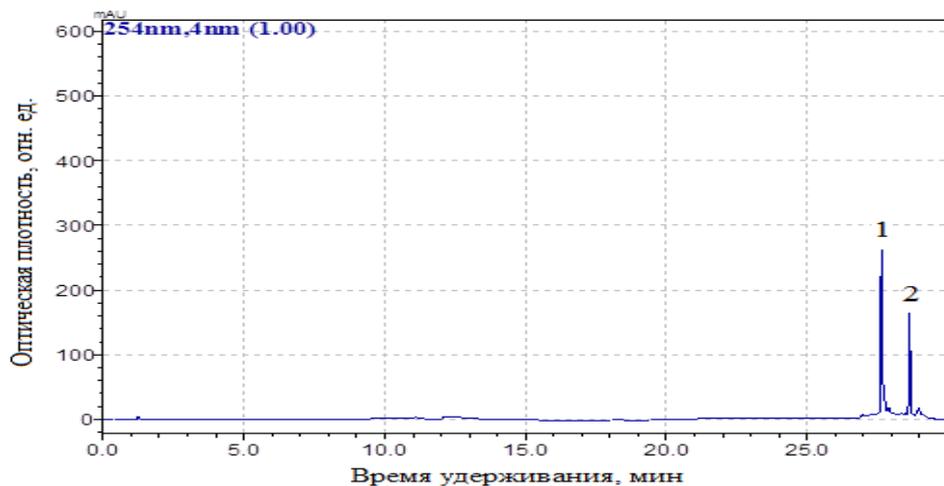


Рис.3.4. Хроматограмма плацебо (время удерживания пика №1 – 27,63 мин; пик №2 – 28,64 мин)

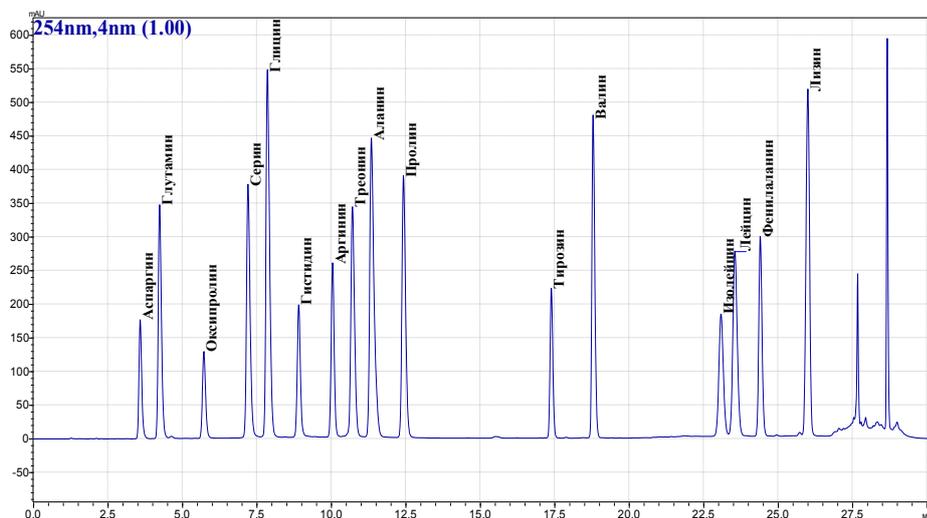


Рис.3.5. Хроматограмма стандартного раствора анализируемых веществ (время удерживания пика ФТК-производного глицина – 7,82 мин; пик ФТК-производного аланина – 11,31 мин; пика ФТК-производного пролина – 12,39 мин)

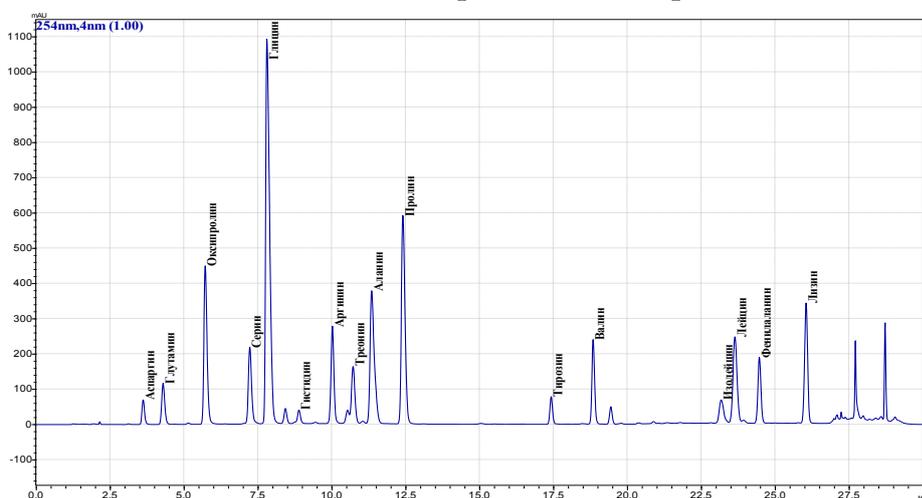


Рис.3.6. Хроматограмма исследуемого раствора (время удерживания пика ФТК-производного глицина – 7,80 мин; пик ФТК-производного аланина – 11,34 мин; пика ФТК-производного пролина – 12,39 мин)

Из данных, представленных на рис. 3.3-3.6, видно, что пики определяемых веществ хорошо разделены между собой и не накладываются на пики примесей из растворителя и на пики вспомогательных веществ (плацебо).

Критериями оценки специфичности методики являются: УФ-спектры и времена удерживания определяемых компонентов (рис. 3.7 - 3.9 и табл.3.1.,3.2.).

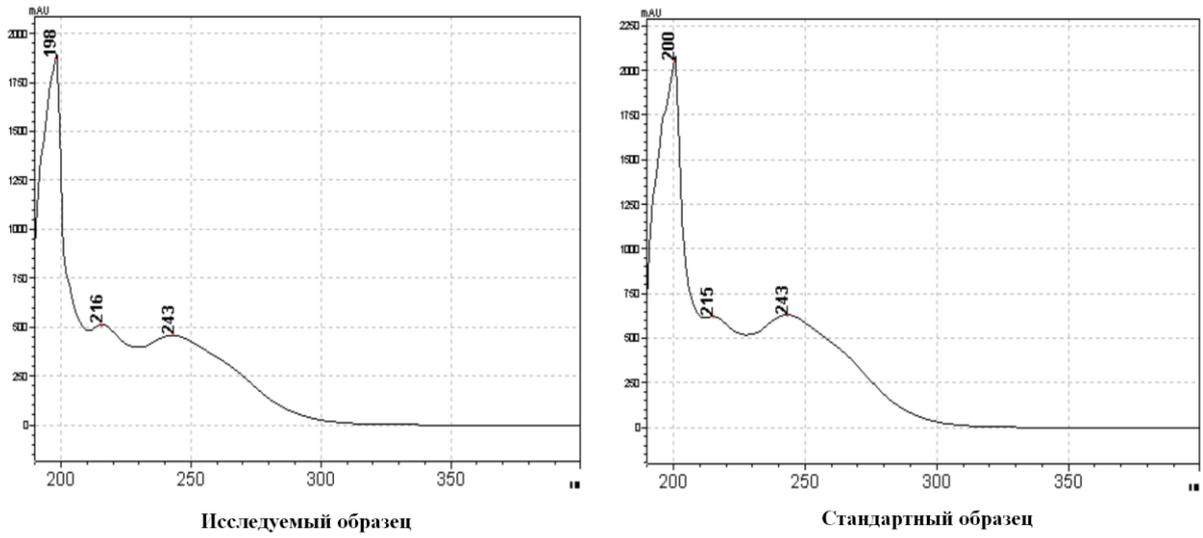


Рис. 3.7. УФ-спектр ФТК-производного глицина

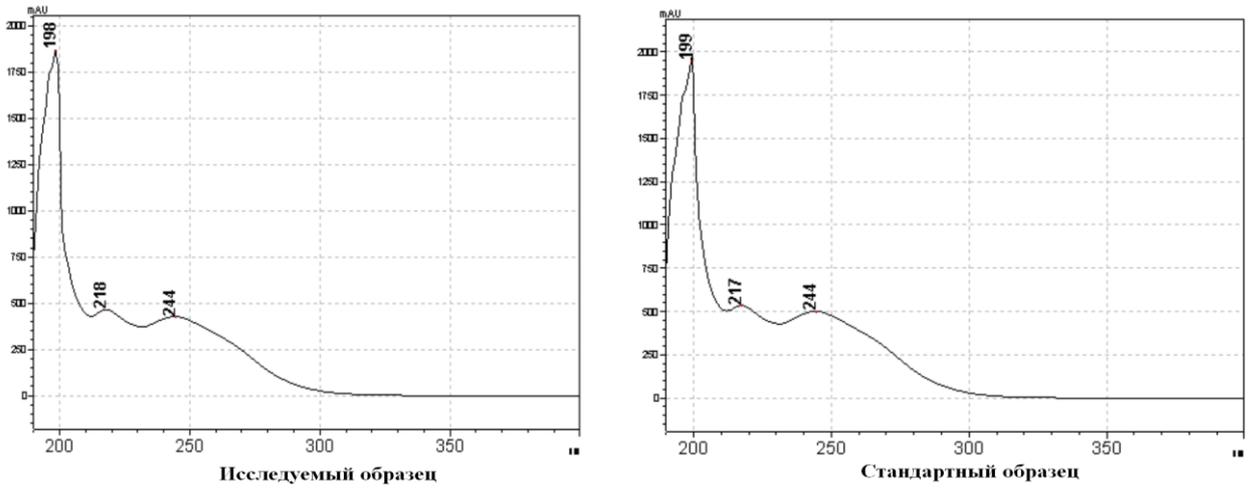


Рис. 3.8. УФ-спектр ФТК-производного аланина

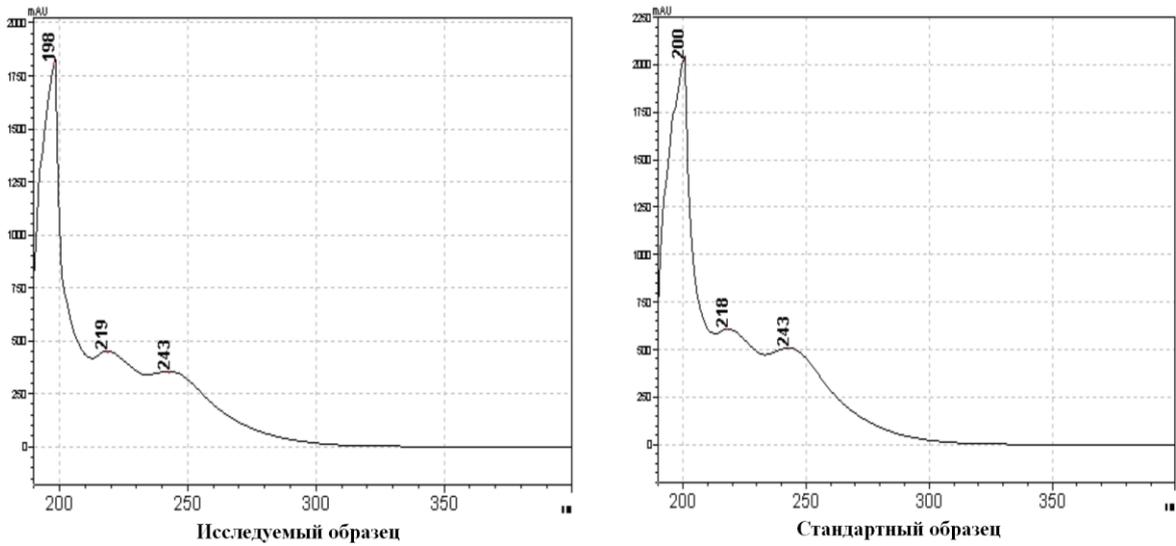


Рис. 3.9. УФ-спектр ФТК-производного пролина

**Времена удерживания ФТК - производных основных аминокислот
марала пантов измельченных и СО**

Компоненты (ФТК- производные аминокислот)	Время удерживания, мин		Стандартное отклонение, %	
	Исследуемый образец	Стандартный образец	Исследуемый образец	Рекомендуемое значение
Глицин	7,8	7,82	0,014	Не более 0,5
Аланин	11,34	11,31	0,021	
Пролин	12,39	12,39	0	

Таблица 3.2

**Максимумы поглощения ФТК-производных основных аминокислот
марала пантов измельченных и СО**

Компоненты (ФТК- производные аминокислот)	Максимум поглощения, нм		Рекомендуемое значение
	Исследуемый образец	Стандартный образец	
Глицин	198; 216; 243	200; 215; 243	±2 нм
Аланин	198; 218; 244	199; 217; 244	
Пролин	198; 219; 243	200; 218; 243	

Из представленных выше данных видно, что спектральные отношения анализируемых веществ в исследуемых и стандартных образцах находятся в допустимом пределе ± 2 нм. Времена удерживания анализируемых веществ несущественно отличаются от времени удерживания соответствующих стандартных образцов, а стандартное отклонение не превышает 0,5% (нормы, указанной в технической документации прибора). Максимумы поглощения анализируемых веществ в исследуемых и стандартных образцах находятся в допустимом пределе ± 2 нм.

Пригодность хроматографической системы. Пригодность хроматографической системы (ХС) определяли путем хроматографирования раствора СО и исследуемого раствора, затем проверяли соответствие полученных результатов требованиям пригодности ХС по основным показателям: коэффициент асимметрии пика, критерии разделяющей способности ХС, коэффициент емкости, эффективность хроматографической колонки (табл. 3.3 и 3.4) [117, 118].

Характеристики пригодности хроматографической системы

Компоненты	Коэффициент асимметрии пика, T	Коэффициент разделения пиков, R_s	Коэффициент емкости, k'	Эффективность хроматографической колонки т.т., N
<i>Стандартный образец</i>				
Глицин	1,46	2,75	5,29	17166
Аланин	1,58	2,48	8,08	27882
Пролин	1,31	4,31	8,95	42749
<i>Исследуемый образец</i>				
Глицин	1,82	2,42	5,27	14004
Аланин	1,55	2,08	8,12	27776
Пролин	1,37	2,58	8,97	41936
Рекомендуемые значения	$T \leq 2,0$	$R_s > 1,5$	$k' \geq 2,0$	$N \geq 1000$

Таблица 3.4

Критерий воспроизводимости площадей пиков ФТК-производных аминокислот марала пантов измельченных и СО

№ п/п	Площадь пиков ФТК-производных аминокислот, отн. ед.					
	Глицин		Аланин		Пролин	
	СО	Исследуемый образец	СО	Исследуемый образец	СО	Исследуемый раствор
1	4727256	10140015	4171439	3876055	3366470	5119489
2	4737153	10237559	4171451	3828512	3424470	5179395
3	4747386	10140015	4211425	3876055	3368741	5119489
4	4737869	10157891	4168312	3912433	3354783	5186129
5	4838795	10254893	4145423	3874256	3412589	5235461
6	4762254	10175896	4197524	3914253	3418712	5125483
S ср	4758452	10184378	4177596	3880261	3390961	5160908
SD	41091,14	50020,48	23402,95	31432,13	30864,63	47375,13
RSD \leq 2,0 %	0,86	0,49	0,56	0,81	0,91	0,92

На основании данных табл. 3.3 и 3.4 можно сделать заключение, что данная хроматографическая система может быть использована для анализа аминокислот в МПИ.

3.4. Валидационная оценка методики количественного определения аминокислот

В основу количественного определения была положена методика качественного обнаружения, т.к. обеспечивала хорошее разделение пиков.

Содержание аминокислот (X, %) определяли с использованием метода абсолютной градуировки. Расчет проводили по формуле:

$$X = \frac{C \times V_1 \times V_3}{V_2 \times m} \times 100\%$$

, где

C – массовая концентрация аминокислоты, полученная по градуировочной характеристике, мг/см³; V_1 – объем воды, используемый для растворения сухих проб после модификации, см³; V_2 – объем аликвоты гидролизата пробы, взятой для модификации, см³; V_3 – объем хлористоводородной кислоты 6 моль/дм³, добавляемой для гидролиза пробы, см³; m – навеска сырья, взятая для гидролиза, мг.

Валидационную оценку методики количественного определения основных аминокислот (глицина, аланина, пролина) марала пантов осуществляли согласно ГФ XIII изд., Том 1, ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» по следующим характеристикам: линейность, правильность и прецизионность в условиях повторяемости [26].

Линейность методики – это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики.

Определение линейности проводили на 6 уровнях концентрации от теоретического содержания определяемого вещества, т. е. готовили растворы стандартных веществ в концентрациях 25, 50, 75, 100, 125 и 150% от номинального значения. Затем измеряли аналитический сигнал (площадь пика) для проб с различными концентрациями определяемых веществ (табл. 3.5).

Критерием линейности является коэффициент корреляции. Если его величина близка к единице, то совокупность данных можно описать прямой линией.

Таблица 3.5

**Линейность методики ФТК-производных основных аминокислот
марала пантов измельченных**

Концентрация от номинального значения, %	Глицин	Аланин	Пролин
1	2	3	4
<i>Концентрация ФТК-производного, мг/мл</i>			
25	0,0075	0,0075	0,0075
50	0,0150	0,0150	0,0150
75	0,0225	0,0225	0,0225
100	0,0300	0,0300	0,0300
125	0,0375	0,0375	0,0375
150	0,0450	0,0450	0,0450

Таблица 3.5 (продолжение)

1	2	3	4
<i>Аналитический отклик (площадь пика, отн.ед.)</i>			
25	1280885	1243665	928054
50	2394260	2296901	1769222
75	3523719	3093855	2563483
100	4727256	4161439	3366470
125	5759289	4956832	4196778
150	6824908	5901597	5016201

Величина коэффициента корреляции должна быть не ниже 0,99 (рис. 3.10. - 3.12).

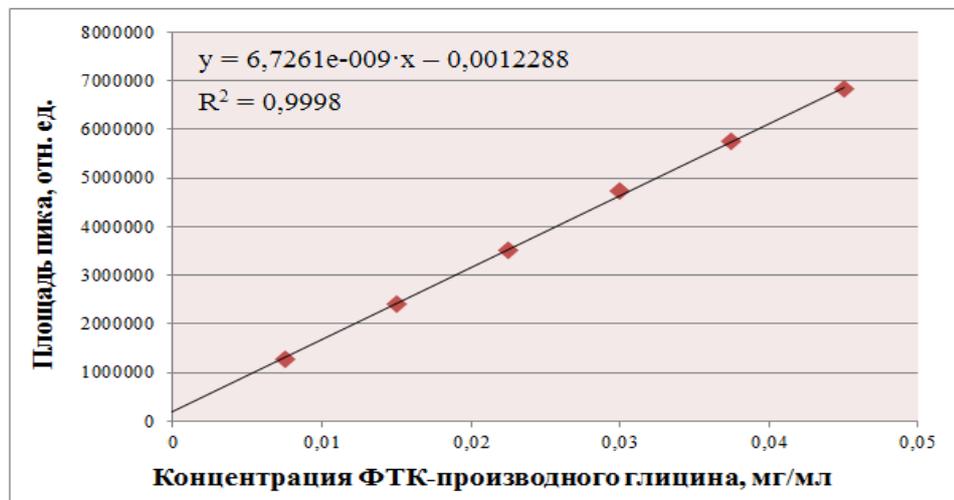


Рис. 3.10. Линейность методики количественного определения ФТК-производного глицина

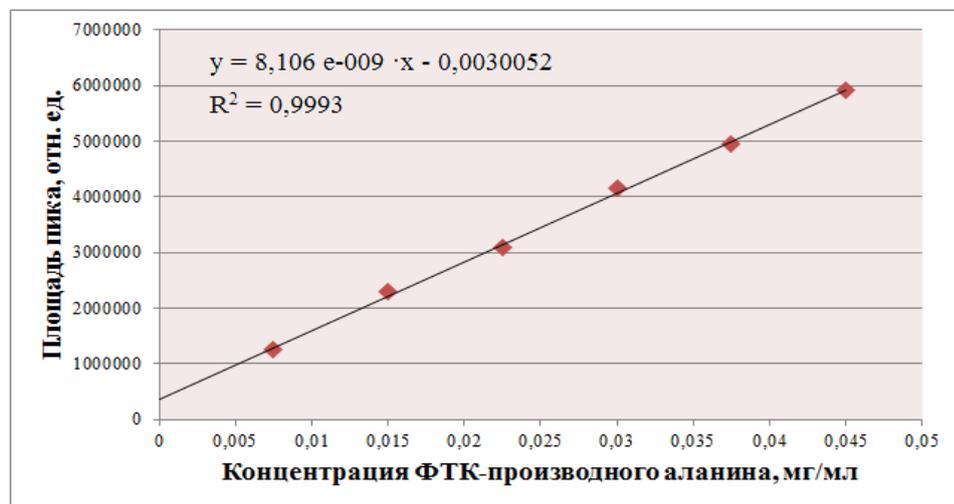


Рис. 3.11. Линейность методики количественного определения ФТК-производного аланина

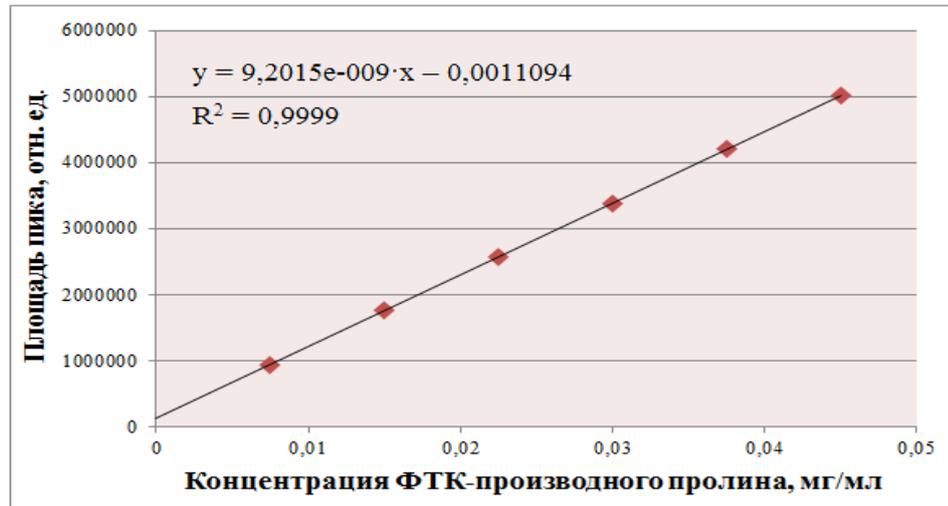


Рис. 3.12. Линейность методики количественного определения ФТК-производного пролина

Установлено, что зависимость величины аналитического сигнала (отклика) от количества определяемого вещества в пробе в диапазоне концентраций от 25 до 150% от номинального значения носит линейный характер. Коэффициент корреляции для всех определяемых веществ соответствует рекомендуемым значениям (не ниже 0,99).

Аналитическая область методики была установлена по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейные модели, и составляла от 25 до 150%. Следует отметить, что диапазон применения для методик количественного определения должен составлять не менее. Чем от 80 до 120% от номинального значения определенной аналитической характеристики.

Правильность методики – это близость экспериментальных результатов, получаемых с использованием аналитической методики, к истинному значению во всей области действия аналитической методики. Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания ФТК-производных аминокислот в растворах, полученных путем добавления необходимого количества СО аминокислот к исследуемому раствору до концентраций 115, 125, 150 и 175%. Критерии приемлемости – средний процент восстановления, скорректированный на 100% (\bar{z}), средняя величина которого должна находиться в пределах $100 \pm 5\%$ и не выходить за пределы доверительного интервала (табл. 3.6-3.8).

Таблица 3.6

**Определение правильности методики (результаты опытов с добавками)
ФТК-производного глицина**

№	Содержание, мг/мл	Добавлено СО, мг/мл	Ожидаемое содержание, мг/мл	Полученное содержание, мг/мл	Ошибка, %
1	2	3	4	5	6

Табл. 3.6. (продолжение)

1	2	3	4	5	6
1	0,0637	0,0045	0,0682	0,0695	101,86
2	0,0637	0,0045	0,0682	0,0679	99,59
3	0,0637	0,0045	0,0682	0,0690	101,13
4	0,0637	0,0075	0,0712	0,0702	98,61
5	0,0637	0,0075	0,0712	0,0701	98,48
6	0,0637	0,0075	0,0712	0,0701	98,44
7	0,0637	0,0150	0,0787	0,0772	98,13
8	0,0637	0,0150	0,0787	0,0775	98,53
9	0,0637	0,0150	0,0787	0,0782	99,38
10	0,0637	0,0225	0,0862	0,0854	99,11
11	0,0637	0,0225	0,0862	0,0874	101,43
12	0,0637	0,0225	0,0862	0,0876	101,58
Средний процент восстановления (\bar{z}), %			$\bar{z} = 99,69\%$		
Доверительный интервал (Δz)			$\Delta z = 0,90$		

Таблица 3.7

**Определение правильности методики (результаты опытов с добавками)
ФТК-производного аланина**

№	Содержание, мг/мл	Добавлено СО, мг/мл	Ожидаемое содержание, мг/мл	Полученное содержание, мг/мл	Ошибка, %
1	0,0274	0,0045	0,0319	0,0312	97,93
2	0,0274	0,0045	0,0319	0,0327	102,41
3	0,0274	0,0045	0,0319	0,0321	100,63
4	0,0274	0,0075	0,0349	0,0335	96,10
5	0,0274	0,0075	0,0349	0,0350	100,23
6	0,0274	0,0075	0,0349	0,0348	99,66
7	0,0274	0,0150	0,0424	0,0415	97,95
8	0,0274	0,0150	0,0424	0,0426	100,42
9	0,0274	0,0150	0,0424	0,0425	100,17
10	0,0274	0,0225	0,0499	0,0492	98,68
11	0,0274	0,0225	0,0499	0,0495	99,14
12	0,0274	0,0225	0,0499	0,0468	93,77
Средний процент восстановления (\bar{z}), %			$\bar{z} = 98,92\%$		
Доверительный интервал (Δz)			$\Delta z = 1,46$		

Таблица 3.8

**Определение правильности методики (результаты опытов с добавками)
ФТК-производного пролина**

№	Содержание, мг/мл	Добавлено СО, мг/мл	Ожидаемое содержание, мг/мл	Полученное содержание, мг/мл	Ошибка, %
1	2	3	4	5	6
1	0,0433	0,0045	0,0478	0,0475	99,46
2	0,0433	0,0045	0,0478	0,0476	99,56

1	2	3	4	5	6
3	0,0433	0,0045	0,0478	0,0473	98,87
4	0,0433	0,0075	0,0508	0,0502	98,66
5	0,0433	0,0075	0,0508	0,0505	99,37
6	0,0433	0,0075	0,0508	0,0512	100,79
7	0,0433	0,0150	0,0583	0,0583	99,93
8	0,0433	0,0150	0,0583	0,0568	97,44
9	0,0433	0,0150	0,0583	0,0587	100,75
10	0,0433	0,0225	0,0658	0,0661	100,52
11	0,0433	0,0225	0,0658	0,0672	102,07
12	0,0433	0,0225	0,0658	0,0654	99,44
Средний процент восстановления (\bar{z}), %			$\bar{z} = 97,74\%$		
Доверительный интервал (Δ)			$\Delta = 0,76$		

По данным табл. 3.6-3.8 видно, что среднее значения выхода для каждого из действующих веществ не превышает рекомендуемых значений.

Прецизионность в условиях повторяемости оценивали в одинаковых условиях одной лаборатории, при выполнении одним аналитиком, на одном и том же оборудовании, с использованием одного и того же набора реактивов. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения (табл. 3.9).

Таблица 3.9

Правильность и прецизионность в условиях повторяемости методики определяемых веществ (ФТК-производных аминокислот)

Критерий валидации	Исследуемая методика			Рекомендуемое значение
	Глицин	Аланин	Пролин	
Правильность (результаты опытов с добавками)				
Открываемость R , %	98,13-101,86	93,77-102,41	97,44-102,07	95-105
Прецизионность в условиях повторяемости				
Среднее значение ($n=6$), мг/мл	6,32	2,74	4,33	
Относительное стандартное отклонение RSD , %	0,54	0,51	0,46	$RSD \leq 2,0$

Согласно данным табл. 3.9 можно сделать заключение, что средний процент восстановления, находится в требуемых пределах ($100 \pm 5\%$) и не выходит за пределы доверительного интервала. Относительное стандартное отклонение для каждого из действующих веществ не превышает 2%.

Аналитическая область методики была установлена по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели, и составила от 25 до 150%. Следует отметить, что диапазон применения для методик количественного определения должен составлять не менее чем от 80 до 120% от номинального значения определяемой аналитической характеристики.

Таким образом, вышеприведенная методика количественного определения аминокислот может быть использована для стандартизации МПИ и положена в основу стандартизации лекарственных препаратов на их основе, т.к. экспериментальным путем установлены параметры специфичности, пригодности хроматографической системы, линейности, диапазона применения, правильности и прецизионности.

Результаты апробации *методики количественного определения аминокислот (глицина, аланина, пролина)* на 5 сериях МПИ, представлены в таблице 3.10.

Из данных, представленных в таблица 3.10-3.12, видно, что содержание глицина в исследуемых сериях МПИ варьирует от $5,84 \pm 0,03\%$ до $7,10 \pm 0,08\%$, аланина от $2,15 \pm 0,06\%$ до $2,76 \pm 0,05\%$ и пролина от $4,11 \pm 0,07\%$ до $4,76 \pm 0,08\%$.

Таблица 3.10

Метрологические характеристики количественного определения глицина в пантах марала измельченных методом ВЭЖХ

Серия	n	X _i , %	f	\bar{x} , %	S ²	S	S _{равн}	P, %	t (P,f)	$\Delta_{\bar{x}}$	$\bar{x}_{\text{равн}}$, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	5	6,15 6,30 6,38 6,48 6,40	4	6,34	0,0156	0,1249	0,0558	95	2,78	0,15	2,45
2	5	6,30 6,55 6,28 6,37 6,46	4	6,39	0,0127	0,1130	0,0505	95	2,78	0,14	2,18
3	5	6,41 6,34 6,55 6,26 6,32	4	6,37	0,0007	0,0259	0,0116	95	2,78	0,03	0,37
4	5	7,17 7,01 7,15 7,05 7,12	4	7,10	0,0045	0,0678	0,0303	95	2,78	0,08	1,18

Таблицы 3.10 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	5	5,88 5,85 5,82 5,80 5,86	4	5,84	0,0010	0,0319	0,0142	95	2,78	0,03	0,67

Примечание: статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.1 для Windows, относительная ошибка среднего рассчитывалась с помощью программы Microsoft Excel по формуле ГФ XIII изд. (раздел 2.6).

Таблица 3.11

Метрологические характеристики количественного определения аланина в пантах марала измельченных методом ВЭЖХ

Серия	n	X _i , %	f	\bar{x} , %	S ²	S	S _{равн}	P, %	t (P,f)	$\Delta_{\bar{x}}$	$\bar{x}_{\text{равн}}$, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	5	2,74 2,71 2,77 2,79 2,80	4	2,76	0,0018	0,0427	0,0191	95	2,78	0,05	1,92
2	5	2,55 2,51 2,42 2,45 2,39	4	2,46	0,0042	0,0654	0,0292	95	2,78	0,08	3,30
3	5	2,15 2,22 2,19 2,12 2,08	4	2,15	0,0030	0,0554	0,0247	95	2,78	0,06	3,20
4	5	2,32 2,28 2,30 2,27 2,32	4	2,29	0,0005	0,0228	0,0101	95	2,78	0,02	1,23

Таблица 3.11 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	5	2,62 2,65 2,68 2,58 2,55	4	2,61	0,0027	0,0522	0,0233	95	2,78	0,06	2,48

Примечание: статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.1 для Windows, относительная ошибка среднего рассчитывалась с помощью программы Microsoft Excel по формуле ГФ XIII изд. (раздел 2.6)

Таблица 3.12

Метрологические характеристики количественного определения пролина в пантах марала измельченных методом ВЭЖХ

Серия	n	$X_i, \%$	f	$\bar{x}, \%$	S^2	S	$S_{\bar{x}}$	P, %	t (P,f)	$\Delta_{\bar{x}}$	$\bar{x}, \%$
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	5	4,83 4,75 4,72 4,85 4,69	4	4,76	0,0048	0,0694	0,0312	95	2,78	0,08	1,81
2	5	4,59 4,52 4,50 4,48 4,64	4	4,54	0,0044	0,0669	0,0299	95	2,78	0,08	1,83
3	5	4,08 4,12 4,15 4,03 4,18	4	4,11	0,0034	0,0589	0,0263	95	2,78	0,07	1,78
4	5	4,30 4,28 4,35 4,38 4,23	4	4,30	0,0034	0,0589	0,0263	95	2,78	0,07	1,69

Таблицы 3.12 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	5	4,36 4,41 4,38 4,43 4,32	4	4,38	0,0018	0,0430	0,0192	95	2,78	0,05	1,22

Примечание: статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.1 для Windows, относительная ошибка среднего рассчитывалась с помощью программы Microsoft Excel по формуле ГФ XI изд. (раздел 2.6).

3.5. Оценка качества марала пантов измельченных, полученных по традиционной технологии

По данным литературы и результатам наших исследований (раздел 3.2) установлено, что не все требования к качеству МПИ учтены при использовании традиционной технологии, в связи с чем, в качестве основных показателей качества МПИ нами были выбраны следующие показатели: описание, потеря в массе при высушивании, зола общая, размер частиц, качественный состав и количественное содержание аминокислот и микробиологическая чистота.

Описание (внешний вид, цвет, запах) оценивали органолептически (раздел 2.4.1 и табл.4.1). Все серии марала пантов измельченных представляли собой однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом (рис.3.13).



Рис.3.13. Марала панты измельченные полученные по традиционной технологии

Потерю в массе при высушивании МПИ определяли стандартным методом по методике ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании». Установлено, что потеря в массе при высушивании сырья варьирует в пределах от $6,40 \pm 0,07$ % до $6,81 \pm 0,11$ %.

Золу общую МПИ определяли по методике ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая». Установлено, что зола общая исследуемого сырья варьирует от $32,73 \pm 0,15$ % до $36,22 \pm 0,05$ %.

Размер частиц изучаемого сырья определяли ситовым анализом с помощью стандартного набора сит (диаметр отверстий 2,0, 1,0, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 и 0,1 мм) по методике ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.1.0015.15 «Ситовой анализ» (раздел 2.4.). Результаты исследований представлены в табл. 3.13

Фракционный состав марала пантов измельченных

Размер отверстий сит, мм	Содержание, %	Размер отверстий сит, мм	Содержание, %
<i>Серия 1</i>			
> 2,0	0,00	> 0,3 < 0,4	36,15
> 1,0 < 2,0	2,50	> 0,2 < 0,3	10,21
> 0,5 < 1,0	12,26	> 0,1 < 0,2	5,43
> 0,4 < 0,5	32,50	< 0,1	0,95
<i>Серия 2</i>			
> 2,0	0,00	> 0,3 < 0,4	34,26
> 1,0 < 2,0	3,12	> 0,2 < 0,3	10,53
> 0,5 < 1,0	14,52	> 0,1 < 0,2	3,88
> 0,4 < 0,5	32,85	< 0,1	0,75
<i>Серия 3</i>			
> 2,0	0,00	> 0,3 < 0,4	35,44
> 1,0 < 2,0	2,75	> 0,2 < 0,3	11,12
> 0,5 < 1,0	13,35	> 0,1 < 0,2	4,63
> 0,4 < 0,5	31,85	< 0,1	0,86

В результате анализа данных, представленных в табл. 3.13, установлено, что исследуемые серии марала пантов измельченных имеют неоднородный состав с преобладанием фракции от 0,3 до 0,4 мм (от 34,26% до 36,15%), при этом присутствуют фракции с размером частиц 0,1 мм (от 0,75% до 0,95%), от 0,1 мм до 0,2 мм (от 3,88% до 5,43%), от 0,2 мм до 0,3 мм (от 10,21% до 11,12%), от 0,4 мм до 0,5 мм (от 31,85% до 32,85%), от 0,5 мм до 1,0 мм (от 12,26% до 14,52%), от 1,0 мм до 2,0 мм (от 2,50% до 3,12%).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в технологический процесс получения МПИ для исключения раздражающего действия костно-хрящевой ткани на слизистую поверхность ЖКТ, следует ввести стадию отсева крупных фракций с повторным измельчением до более мелких частиц и использовать оборудование для более тонкого измельчения.

Подлинность марала пантов измельченных оценивали по основной группе БАВ марала пантов - аминокислотам (глицин, аланин, пролин), с использованием валидированной нами методики ВЭЖХ, основанной на расщеплении пептидных связей белков, модификации фенилизотиоционатом и дальнейшем разделении полученных

производных на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence («SHIMADZU», Япония) с УФ-детектором (разделы 2.2.2, 2.3) Данные проведенных нами исследований представлены на рис. 4.4.

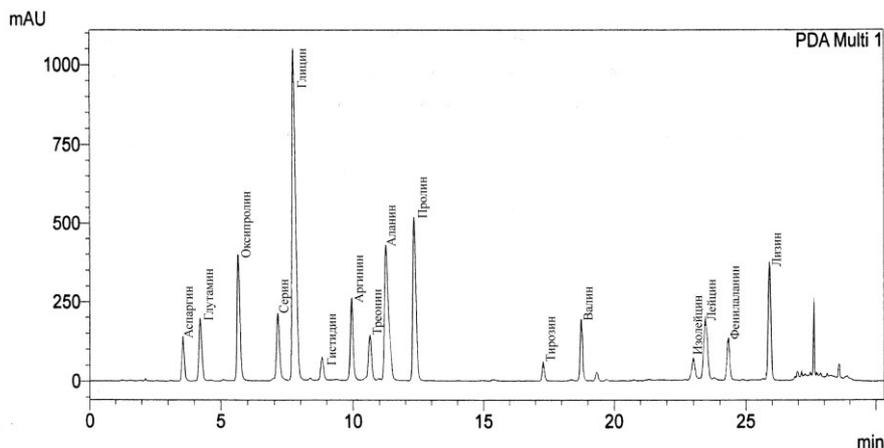


Рис.3.14. Хроматограмма аминокислот марала пантов измельченных

Анализ представленных данных (рис.3.14) позволяет сделать заключение, что исследуемые серии МПИ содержат 16 производных аминокислот, обнаруженных нами ранее в данном сырье (раздел 3.1), в том числе 3 основные аминокислоты МПИ такие как, глицин, аланин, пролин.

Сравнительная оценка времен удерживания пиков основных аминокислот исследуемых образцов МПИ и СО аминокислот представлена в табл. 3.14.

Исследования показали, что время удерживания глицина варьирует от 7,79 до 7,84 мин, аланина от 11,33 до 11,35 мин и пролина от 12,39 до 12,44 мин. Стандартное

Таблица 3.14

Сравнительная оценка времен удерживания пиков СО аминокислот и основных аминокислот в пантах марала измельченных

№ серии	Время удерживания пика СО, мин	Время удерживания пика исследуемого образца, мин	Отклонение, %
1	2	3	4
<i>Глицин</i>			
1	7,82	7,84	0,25
2	7,82	7,79	0,38
3	7,82	7,82	0
4	7,82	7,81	0,12
5	7,82	7,81	0,12

Таблица 4.2 (продолжение)

1	2	3	4
<i>Аланин</i>			
1	11,31	11,33	0,18
2	11,31	11,34	0,26
3	11,31	11,34	0,26
4	11,31	11,35	0,35
5	11,31	11,35	0,35
<i>Пролин</i>			
1	12,39	12,43	0,32
2	12,39	12,44	0,40
3	12,39	12,39	0
4	12,39	12,43	0,32
5	12,39	12,43	0,32
Отклонение не более 0,5%			

отклонение между временем удерживания пиков СО глицина, аланина, пролина и соответствующих аминокислот исследуемых образцов не превышает 0,5%.

В основу количественного определения основных аминокислот таких, как глицин, пролин и аланин, была положена методика качественного обнаружения, т.к. обеспечивала хорошее разделение пиков (раздел 2.3).

Микробиологическая чистота. Определение микробиологической чистоты исследуемой серии марала пантов измельченных проводили на базе Барнаульского филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту» согласно требований ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» (раздел 2.4).

Обобщенные данные проведенных исследований по изучению *количественного содержания АК и микробиологической чистоты МПИ* представлены в табл.3.15

Основные показатели качества марала пантов измельченных

№ серии	Количественное содержание АК, %			Микробиологическая чистота		
	Глицин	Аланин	Пролин	Требование ГФ XIII изд. ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота»	МПИ	Заключение
1	6,38±0,10	2,67±0,11	4,67±0,09	<i>Общее число аэробных бактерий, Кое/г</i> Не более 10 ⁴ в 1г	<i>Общее число аэробных бактерий, Кое/г</i> 2,6x10 ⁴ в 1г	Не соответствует категории 3Б по показателям общее число аэробных бактерий и энтеробактерий
				<i>Общее число грибов, Кое/г</i> Не более 10 ² в 1г	<i>Общее число грибов, Кое/г</i> Менее 10 ² в 1г	
				<i>Энтеробактерии, Кое/г</i> Не более 10 ² в 1г	<i>Энтеробактерии, Кое/г</i> Более 10 ³ в 1г	
2	6,41±0,06	2,38±0,08	4,46±0,10	То же	То же	То же
3	6,27±0,08	2,19±0,09	4,12±0,05	То же	То же	То же
4	6,95±0,15	2,21±0,06	4,31±0,07	То же	То же	То же
5	5,82±0,08	2,71±0,07	4,35±0,06	То же	То же	То же

Анализ данных представленных в табл.3.15 свидетельствует о том, что содержание основных аминокислот МПИ в полученных сериях МПИ варьирует в пределах от $5,82 \pm 0,08\%$ до $6,95 \pm 0,15\%$ (глицин), от $2,19 \pm 0,09\%$ до $2,71 \pm 0,07\%$ (аланин) и от $4,12 \pm 0,05\%$ до $4,67 \pm 0,09\%$ (пролин).

Выявлено, что все полученные серии МПИ не соответствуют требованиям ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» по показателю «микробиологическая чистота»: общее число аэробных бактерий и энтеробактерий превышает требуемые показатели (не более 10^4 Кое/г, не более 10^2 в 1г) и составляет $2,6 \times 10^4$ Кое/г и 10^3 в 1г соответственно. При этом все серии МПИ соответствуют требованиям по показателю «общее число грибов». Вышеизложенное указывает на то, что необходимо провести дополнительные исследования по обеспечению микробиологической чистоты МПИ.

Таким образом, данные проведенных исследований свидетельствуют о том, что в технологический процесс получения МПИ должны быть введены дополнительные стадии по обеспечению надлежащей измельченности и микробиологической чистоты конечного продукта.

Выводы по главе

1. Марала панты измельченные, полученные по традиционной технологии, обладают следующими показателями потери в массе при высушивании (от $6,40 \pm 0,07\%$ до $6,81 \pm 0,11\%$); золы общей (от $32,73 \pm 0,15\%$ до $36,22 \pm 0,05\%$); имеют фракционный состав с преобладанием частиц размером от 0,3 до 0,4 мм (от $34,26\%$ до $36,15\%$), содержат 16 производных аминокислот с преобладанием основных аминокислот, таких, как глицин ($\tau=7,81$ мин), аланин ($\tau=11,34$ мин) и пролин ($\tau=12,42$ мин), содержание которых варьирует в пределах от $5,82 \pm 0,08\%$ до $6,95 \pm 0,15\%$, от $2,19 \pm 0,09\%$ до $2,71 \pm 0,07\%$ и от $4,12 \pm 0,05\%$ до $4,67 \pm 0,09\%$ соответственно.

2. Выявлено, что марала панты измельченные, полученные по традиционной технологии, не соответствуют требованиям ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» и по показателю «микробиологическая чистота»: общее число аэробных бактерий и энтеробактерий превышает требуемые показатели (не более 10^4 Кое/г, не более 10^2 в 1г) и составляет $2,6 \times 10^4$ Кое/г и 10^3 в 1г соответственно. При этом все серии марала пантов измельченных соответствуют

требованиям по показателю «общее число грибов». С учетом наличия в марала пантах измельченных костно-хрящевой ткани требуют дополнительного измельчения.

3. Используемые условия хроматографирования (элюент А - ацетатный буфер 0,06 моль/дм³; элюент Б - ацетонитрил 100% + 1% изопропилового спирта; элюент С - ацетатный буфер 0,06 моль/дм³; хроматографирование проводили в градиентном режиме, скорость потока подвижной фазы -130 мкл/мин, температуре колонки 55°C; детектирование - в УФ-области при длине волны 254 нм) могут быть использованы для качественного анализа и количественного определения аминокислот марала пантов измельченных (глицина, аланина и пролина) методом ВЭЖХ, так как доказаны пригодность хроматографической системы и специфичность.

4. Разработанная методика количественного определения аминокислот в марала пантах измельченных с использованием метода абсолютной градуировки по СО глицина, аланина, пролина может быть использована для оценки качества марала пантов измельченных и препаратов, полученных на их основе, так как экспериментальным путем установлены показатели линейности ($R^2 = 0,9998$ (глицин), $R^2 = 0,9993$ (аланин), $R^2 = 0,9999$ (пролин), диапазона применения (от 25 до 150%), правильности ($\bar{z} = 99,69 \pm 0,90\%$ глицин, $\bar{z} = 98,92 \pm 1,46\%$ аланин, $\bar{z} = 97,74 \pm 0,76\%$ пролин) и прецизионности в условиях повторяемости ($RSD = 0,54\%$ (глицин), $RSD = 0,51\%$ (аланин), $RSD = 0,46\%$ (пролин)).

5. Установлено, что в марала пантах содержится не менее 16 аминокислот, такие как: глицин, аланин, пролин, аспарагин, глютамин, оксипролин, серин, гистидин, аргинин, треонин, тирозин, валин, изолейцин, лейцин, фенилаланин и лизин. Среди которых преобладают три аминокислоты: глицин (время удерживания $\tau = 7,80$, аланин (время удерживания $\tau = 11,34$), пролин (время удерживания $\tau = 12,39$), которые соответствуют пикам СО глицина, аланина и пролина ($SD < 0,5\%$).

6. Выявлено, что содержание основных аминокислот в исследуемых сериях марала пантов измельченных варьирует в следующих пределах: глицина - от $5,84 \pm 0,03\%$ до $7,10 \pm 0,08\%$; аланина - от $2,15 \pm 0,06\%$ до $2,76 \pm 0,05\%$; пролина - от $4,11 \pm 0,07\%$ до $4,76 \pm 0,08\%$.

Результаты проведенных исследований (Глава 3) отражены в публикациях:

1. Воробьева, С. Р. Сравнительная оценка показателя «описание» измельченных пантов марала 1 и 4 категорий при макроскопическом и

микроскопическом изучении / С. Р. Воробьева, Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Актуальные проблемы фармации: ежегод. сборник науч. работ преподавателей, молодых ученых и студентов фармацевт. факультета. – Барнаул, 2016. – Вып. 13. – С. 40–51.

2. Земцова, Н. П. Анализ состава аминокислот крови и пантов марала методом ВЭЖХ / Н. П. Земцова, К. П. Лунин, В. Ф. Турецкова // Перспективы развития санаторно-курортной помощи и реабилитации в Сибирском регионе: материалы межрегион. науч.-практ. конференции, посвящ. 145-летнему юбилею курорта Белокуриха, 75-летию Алт. края / под ред. Т. В. Кулишовой. – Белокуриха, 2012. – С. 102–103.

3. Земцова, Н. П. Анализ способов получения экстракционных препаратов на основе пантов марала, изюбря и оленя / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Актуальные проблемы фармакологии и фармации: ежегод. сборник науч. и метод. работ преподавателей, молодых ученых и студентов фармацевт. факультета. – Барнаул, 2012. – Вып. 9. – С. 36–43.

4. Земцова, Н. П. Изучение влияния кожного покрова на качество измельченных пантов марала / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Актуальные проблемы фармации: ежегод. сборник науч. работ преподавателей, молодых ученых и студентов фармацевт. факультета. – Барнаул, 2016. – Вып. 13. – С. 63–71.

5. Земцова, Н. П. Определение аминокислот в пантах марала: валидация методики / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова, О. Г. Макарова // Фармация. – Москва, 2016. – № 4. – С. 38–41.

6. Земцова, Н. П. Основные направления повышения качества препаратов на основе измельченных пантов марала / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Актуальные вопросы современной фармацевтической технологии: материалы Всерос. науч.-практ. конференции с междунар. участием. – Пятигорск, 2016. – С. 29–33.

7. Касаткина, А. И. Изучение физико-химических показателей и микробиологической чистоты измельченных пантов марала, полученных без удаления кожного покрова / А. И. Касаткина, Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Актуальные проблемы фармации: ежегод. сборник науч. работ преподавателей, молодых ученых и студентов фармацевт. факультета. – Барнаул, 2015. – Вып. 12. – С. 77–82.

8. Лунин, К. П. Сравнительный анализ качественного состава аминокислот крови и пантов марала методом ВЭЖХ / К. П. Лунин, Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник науч. тр. – Волгоград, 2013. – Вып. 68. – С. 257–259.

9. Медведева, Л. С. Анализ технологических свойств измельченных пантов марала / Л. С. Медведева, Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Актуальные проблемы фармации: ежегод. сборник науч. работ преподавателей, молодых ученых и студентов фармацевт. факультета. – Барнаул, 2014. – Вып. 11. – С. 82–87.

ГЛАВА IV. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ, СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ МАРАЛА ПАНТОВ ИЗМЕЛЬЧЕННЫХ

Анализ данных литературы выявил тот факт, что в настоящее время отсутствуют исследования, направленные на разработку оптимальной технологии получения МПИ, в том числе технологической схемы с установлением критических контрольных точек, обеспечивающей получение продукции надлежащего качества. Вместе с тем следует учитывать, что марала панты являются сырьем животного происхождения и, следовательно, могут быть значительно обсеменены разнообразной микрофлорой. При длительном хранении сырья после срезки и консервирования возможно превышение данного показателя, что было подтверждено нами в эксперименте при анализе традиционной технологии (раздел 3). В связи с этим в технологический процесс получения МПИ должны быть включены стадии и операции, направленные на обеспечение надлежащей микробиологической чистоты МПИ. Кроме того, в процессе изготовления и последующего хранения МПИ должно быть учтено влияние внешних факторов на стабильность сырья и экспериментально установлены сроки хранения.

Ниже приведены экспериментальные данные по разработке рациональной технологии получения МПИ, изучению микробиологической обсемененности исследуемого сырья, поиску методов дополнительной обработки сырья и выявлению факторов внешней среды, оказывающих влияние на показатели качества и стабильность полученного продукта.

4.1. Влияние способов дополнительной обработки марала пантов измельченных на их микробиологическую чистоту

На данном этапе исследований используемая нами технология получения МПИ была аналогична технологии указанной в разделе 4.1. Но при этом был учтен тот факт, что для исключения раздражающего действия костной ткани на слизистую поверхность ЖКТ необходимо получать порошкообразный материал с достаточно высокой измельченностью [89]. В связи с чем в технологический процесс получения МПИ была включена стадия отсева фракций с размером частиц более 0,3 мм с возвратом более крупных частиц на повторное измельчение и замена измельчителя «Эликор – 1» на мельницу шаровую МШ-100 (раздел 2.4).

Кроме того, с целью снижения микробиологической обсемененности МПИ, полученных по вышеизложенной технологии (раздел 4.1) были изучены следующие виды дополнительной обработки: термическая; УФ - и СВЧ -излучение; ионизирующее излучение; обработка спиртом этиловым 70% и 90%. Схема проведения исследования представлена на рис. 4.1.

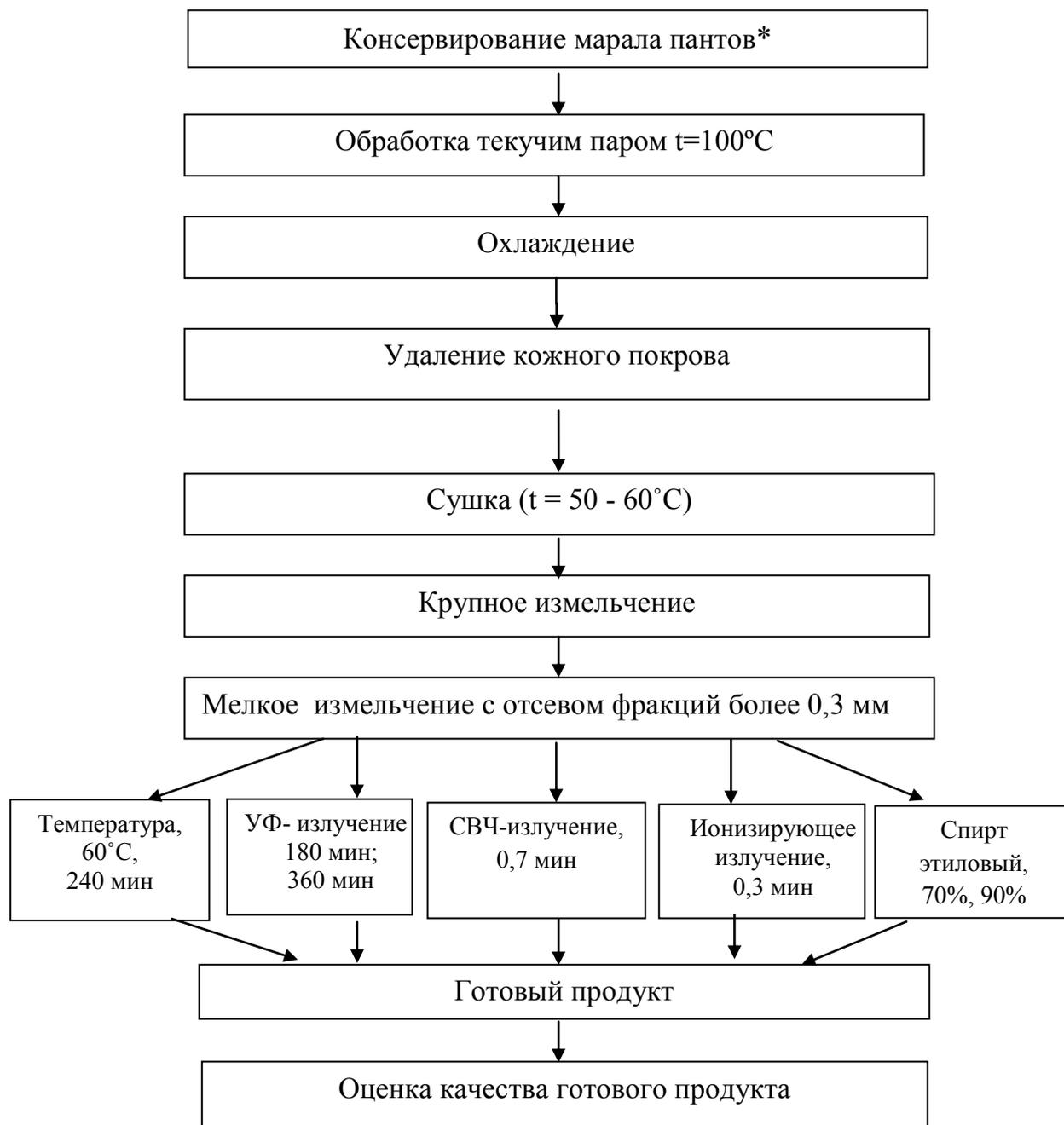


Рис.4.1. Схема получения марала пантов измельченных с дополнительной обработкой сырья

Примечание: *- данная стадия проведена в условиях маральника

Взвешивали 6 порций МПИ (50,0 г), которые помещали в стерильные контейнеры вместимостью 100 мл. Первую часть сырья подвергли дополнительной

термической обработке, вторую – УФ - излучению, третью – СВЧ - излучению, четвертую - ионизирующему излучению, пятую и шестую – спиртом этиловым) с целью уменьшения микробной контаминации. Обработанное сырье помещали в стерильные полимерные контейнеры.

Дополнительную *термическую обработку* МПИ проводили в электрошкафу СНОЛ – 3,5.3,5.3,5/3,5 – И1М при температуре 60°C в течение 240 мин, перемешивая сырье каждые 30 мин (раздел 2.4.11а).

Дополнительную обработку МПИ *УФ-излучением* осуществляли в облучателе хроматографическом УФС 254/365 при длине волны 254 нм в течение 180 мин и 360 мин, при этом перемешивая обрабатываемый материал каждые 30 мин (раздел 2.4.11б).

Дополнительную обработку *СВЧ излучением* проводили в микроволновой печи DAEWOO модели KOR - 6L15 мощностью 700 Вт в течение 0,7 мин (раздел 2.4.11в).

Обработку МПИ *ионизирующим излучением* проводили в герметично закупоренных полимерных контейнерах по 50,0 г на импульсном линейном ускорителе марки ИЛУ – 10 в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН (г. Новосибирск) в условиях, рекомендуемых для обработки лекарственного сырья согласно ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.1.0016.15 «Стерилизация» (доза поглощения 10 кГр). Мониторинг поглощенного продуктом излучения осуществляется при помощи дозиметрических методов ежегодно ФГУП «Всероссийским научно-исследовательским институтом физико-технических и радиотехнических измерений» (ВНИИФТРИ) (раздел 2.4.11г).

Обработку *спиртом этиловым* проводили следующим образом: 50,0 г МПИ заливали 100 мл спирта этилового 70% (90%), выдерживали в течение 5-10 мин в прохладном месте. Полученную массу подвергали сушке в вакуум - сушильном шкафу (ШСВ-45) при температуре 40-50 °С в течение 30 мин до достижения показателя потерь в массе при высушивании не более 7% (раздел 2.4.11д).

В данной серии экспериментов оценку качества МПИ проводили по показателям описание (раздел 2.4.1) и микробиологическая чистота (раздел 2.4.10).

Описание. Во всех случаях субстанция МПИ не изменялась по внешнему виду и запаху и представляла собой однородный красно-коричневый порошок с бурым оттенком, белыми включениями неправильной прямоугольной формы, с

характерным запахом и специфичным вкусом. При рассмотрении под бинокулярном микроскопом Микмед - 6 картина была аналогична (раздел 3.5).

Микробиологическая чистота. Обобщенные данные проведенных исследований по изучению микробиологической чистоты МПИ, подвергнутых различным видам дополнительной обработки, представлены в табл. 4.1.

Сопоставление данных исследуемых образцов по микробиологической обсемененности МПИ до обработки и после различных видов обработки показали, что термическая обработка, обработка УФ - излучением при длине волны 254 нм в течение 180 мин и 360 мин привели к снижению общего числа аэробных бактерий (до $1,1 \times 10^5$ Кое/г и $1,7 \times 10^4$ Кое/г соответственно), но при этом достигнутые результаты также не соответствуют требованиям предъявляемым ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота».

В результате дополнительной обработки СВЧ - излучением не наблюдалось положительной динамики ни по одному из изучаемых показателей. При этом отмечено небольшое увеличение общего числа аэробных бактерий ($2,9 \times 10^4$ Кое/г) по сравнению с исходным уровнем бактерий ($2,6 \times 10^4$ Кое/г).

После воздействия ионизирующим излучением, а также спиртом этиловым 70% и 90% по всем показателям наблюдалось значительное снижение микробиологической обсемененности, в том числе значительно уменьшилось общее число грибов. Все полученные значения по содержанию отдельных видов микроорганизмов соответствовали требованиям, предъявляемым ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» [26].

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что требование по микробиологической чистоте в процессе получения МПИ обеспечивается только в результате воздействия ионизирующего излучения и после обработки спиртом этиловым (70% и 90%), при сохранении внешних признаков исследуемого сырья.

Но в связи с тем, что в дополнительная обработка исследуемого сырья спиртом этиловым является менее экономически выгодной для предприятий переработчиков, т.к. потребует дополнительных материальных затрат (приобретение оборудования, оснащение помещений и т.д.), то дальнейшие исследования МПИ проводили после дополнительной обработки ионизирующим излучением.

Сравнительная характеристика микробиологической чистоты марала пантов измельченных после различных видов дополнительной обработки

№ п/п	Исходные показатели обсемененности	Показатели после дополнительной обработки			Требование ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота»	Заключение
		Общее число аэробных бактерий, Кое/г	Общее число грибов, Кое/г	Энтеробактерии, Кое/г		
1	2	3	4	5	6	7
Термическая обработка						
1	<i>Общее число аэробных бактерий, Кое/г</i> $2,6 \times 10^4$ в 1г <i>Общее число грибов, Кое/г</i> Менее 10^2 в 1г <i>Энтеробактерии, Кое/г</i> Более 10^3 в 1г	$1,1 \times 10^5$	Менее 10^2	Более 10^3	<i>Общее число аэробных бактерий, Кое/г</i> Не более 10^4 в 1г <i>Общее число грибов, Кое/г</i> Не более 10^2 в 1г <i>Энтеробактерии, Кое/г</i> Не более 10^2 в 1г	Не соответствует категории ЗБ по показателям общее число оаэробных бактерий и энтеробактерий
УФ излучение (время воздействия 180 мин)						
2	То же	$1,7 \times 10^4$	Менее 10^2	Более 10^3	То же	Не соответствует категории ЗБ по содержанию аэробных бактерий и энтеробактерий

Таблица 4.1. (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7
3	УФ излучение (время воздействия 360 мин)					
	То же	$1,7 \times 10^4$	Более 10^2	Более 10^3	То же	Не соответствует категории ЗБ по содержанию аэробных бактерий и энтеробактерий
4	СВЧ-излучение					
	То же	$2,9 \times 10^4$	Менее 10^2	Более 10^3	То же	Не соответствует категории ЗБ по содержанию аэробных бактерий и энтеробактерий
5	Ионизирующее излучение					
	То же	1×10^2	Менее 10^1	Менее 10^1	То же	Соответствует категории ЗБ
6	Спирт этиловый 70%					
	То же	$2,4 \times 10^2$	Менее 10^1	Менее 10^1	То же	Соответствует категории ЗБ
7	Спирт этиловый 90%					
	То же	$4,1 \times 10^2$	Менее 10^1	Менее 10^1	То же	Соответствует категории ЗБ

4.2. Влияние обработки ионизирующим излучением марала пантов измельченных на качественный и количественный состав аминокислот

В связи с тем, что обработка ионизирующим излучением обеспечивает надлежащую микробиологическую чистоту, то представляло интерес изучение влияния указанного способа дополнительной обработки на качественный и количественный состав аминокислот МПИ.

Обработку ионизирующим излучением проводили по вышеописанной методике (раздел 4.1). Объектом исследования в указанных экспериментах являлись МПИ после обработки ионизирующим излучением (раздел 2.4.11г).

Исследования качественного и количественного состава аминокислот МПИ, подвергшихся данным видом обработки, проводили с использованием валидированной нами методики, основанной на расщеплении пептидных связей белков фенилизотиоционатом и дальнейшем разделении полученных производных на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence («SHIMADZU», Япония) с УФ-детектором (разделы 2.2.2, 2.3). Результаты проведенных исследований представлены на рис. 4.2 и табл. 4.2.

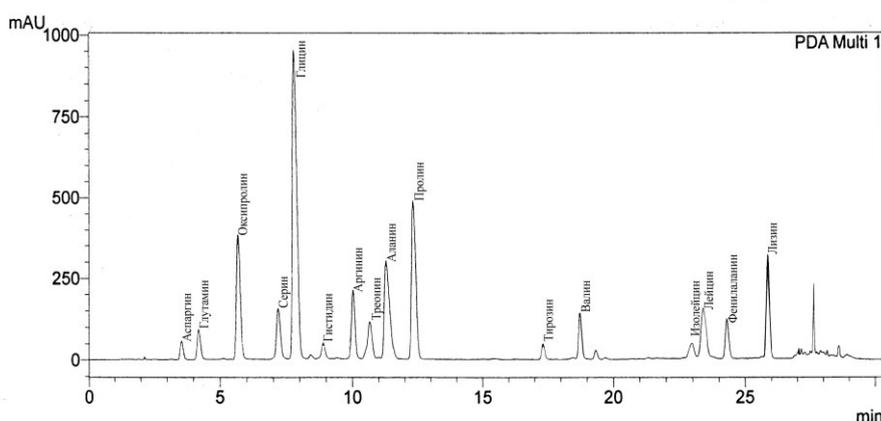


Рис. 4.2. Хроматограмма аминокислот марала пантов измельченных после обработки ионизирующим излучением

Хроматографическая картина производных аминокислот МПИ, подвергшихся обработке, была аналогична исходному сырью (рис. 4.2). При этом установлено наличие 16 производных аминокислот среди которых отмечены пики трех основных аминокислот МПИ: глицина (время удерживания $\tau = 7,81$), пролина (время удерживания $\tau = 11,34$), аланина (время удерживания $\tau = 12,42$). Результаты исследований по

определению количественного содержания аминокислот в МПИ представлены в табл. 4.2.

Таблица 4.2

Сравнительная оценка количественного содержания аминокислот в марала пантах измельченных до и после дополнительной обработки

№ пп	Наименование аминокислоты	До обработки ионизирующим излучением	После обработки ионизирующим излучением
1	Глицин	6,38 ±0,10	6,31±0,12
2	Аланин	2,67±0,11	2,79±0,03
3	Пролин	4,67 ±0,09	4,75±0,08

Выявлено (табл. 4.2), что количественное содержание основных аминокислот после дополнительной обработки МПИ исследуемым способом практически не меняется.

Результаты проведенных исследований по влиянию ионизирующего излучения свидетельствуют о том, что дополнительное воздействие исследуемым способом обработки обеспечивает требование по микробиологической чистоте (категория 3.Б) и сохранение качественного состава и количественного содержания аминокислот в МПИ.

4.3. Влияние обработки ионизирующим излучением марала пантов измельченных на их общетонизирующую активность

Фармакологические эксперименты проводили на сертифицированных половозрелых самках крыс (массой 190-220г), полученных из вивария Института цитологии и генетики СО АН РФ и прошедших 14-дневный карантин (раздел 2.5).

Определение общетонизирующей активности МПИ осуществляли согласно «Методике оценки выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов» (раздел 2.5).

Животные были разделены на 3 группы: 1 – контрольная; 2, 3 – экспериментальные. Контрольная группа крыс ежедневно получала плацебо в виде хлебного шарика объемом 1см³. Животные второй группы получали хлебный шарик смешанный с МПИ «без дополнительной обработки»; животные третьей экспериментальной группы, получали такие же шарики, смешанные с исследуемыми образцами, которые были предварительно подвергнуты дополнительной обработке, в дозе 0,2 г/кг один раз в сутки.

Для определения исходного уровня выносливости крысы всех групп запускались в емкость с водой при температуре 27 - 29°C и грузом 10% от массы тела без получения исследуемых образцов. Аналогичным образом животные помещались в воду на 3, 7 и 10 день эксперимента через один час после получения плацебо или исследуемых образцов марала пантов (раздел 2.5).

Результаты экспериментов по изучению влияния дополнительной обработки на общетонизирующую активность исследуемых серий МПИ представлены в табл.4.3.

В ходе эксперимента наблюдался процесс тренировки животных контрольной группы, который выражался в увеличении времени их нахождения в воде. Показатель удлинения пребывания в воде последовательно возрастал и к концу эксперимента составил 22,1%.

При применении исследуемых образцов МПИ без дополнительной обработки, у крыс второй экспериментальной группы также был зафиксирован более длительный период плавания. Так, на третий день эксперимента, прирост времени плавания крыс (по сравнению с контрольной группой) был достоверно выше и составил 14,9%; на седьмой день - 28,7% и к концу эксперимента - 50,5%. При этом наблюдавшийся эффект тренировки на 3, 7 и 10 день превосходил выше отмеченную тенденцию в контрольной группе. Разница в обнаруженных эффектах (8,9%, 13,7% и 28,4% соответственно) была отнесена к специфическому действию МПИ без дополнительной обработки.

Эффект повышения выносливости сохранялся после приема исследуемых серий, прошедших дополнительную обработку ионизирующим излучением. Так, на 3 день эксперимента прирост времени плавания крыс составил 16,3%. В наибольшей степени эффект проявляется на 7-10 дни применения данных образцов. На 7 день увеличение времени нахождения в воде крыс составило 24,8% и на 10 день – 49,8%. Разница в обнаруженных эффектах (10,3%, 9,8% и 27,7% соответственно) была отнесена к специфическому действию МПИ после дополнительной обработки.

Таким образом, был сделан вывод о возможности использования ионизирующего излучения для дополнительной обработки исследуемого сырья, т.к. в ходе эксперимента выявлено, что значения прироста времени плавания крыс, получавших МПИ без обработки и после обработки ионизирующим излучением, сопоставимы, что говорит о сохранении общетонизирующей активности МПИ.

Таблица 4.3

Влияние дополнительной обработки марала пантов измельченных на время плавания крыс

Группа животных (способ дополнительной обработки)	Исх. уровень плавания	3 день эксперимента		7 день эксперимента		10 день эксперимента	
	Мин.	Мин.	Прирост, %	Мин.	Прирост, %	Мин.	Прирост, %
1 группа (плацебо)	12±0,19*	12,72±0,21* p<0,05	6	13,82±0,26* p<0,001	15	14,65±0,44* p<0,001	22,1
2 группа (плацебо с пантами марала без обработки)	14,1±0,15	16,3±0,42*	14,9	18,15±0,14*	28,7	21,22±0,21*	50,5
3 группа (обработка излучением)	10,91± 0,13	12,69± 0,15*	16,3	13,61± 0,17*	24,8	16,34± 0,20*	49,8

Примечание: * - прирост времени плавания рассчитывался по отношению к исходному уровню плавания исследуемой группы животных.

4.4. Разработка технологической схемы получения марала пантов измельченных

Результаты проведенных исследований положены в основу разработки технологии и технологической схемы получения МПИ, которая заключалась в следующем: на стадиях основного технологического процесса (ТП) удаляют кожный покров, сушат, сначала подвергают крупному измельчению, распиливая пант ножовкой ручной («Inforce 06-08-07) на куски размером 1-3 см, затем мелкому измельчению до размера частиц не более 0,3 мм, после чего просеивают, взвешивают, при этом выход по массе составляет не менее 88%. Полученную массу сырья фасуют в банки полимерные с винтовой горловиной и подвергают дополнительной обработке ионизирующим излучением (раздел 2.4.11г), взвешивают. Упаковку производят в коробки картонные. На банки наклеивают этикетки утвержденной формы (приложение 9) (рис.4.3).

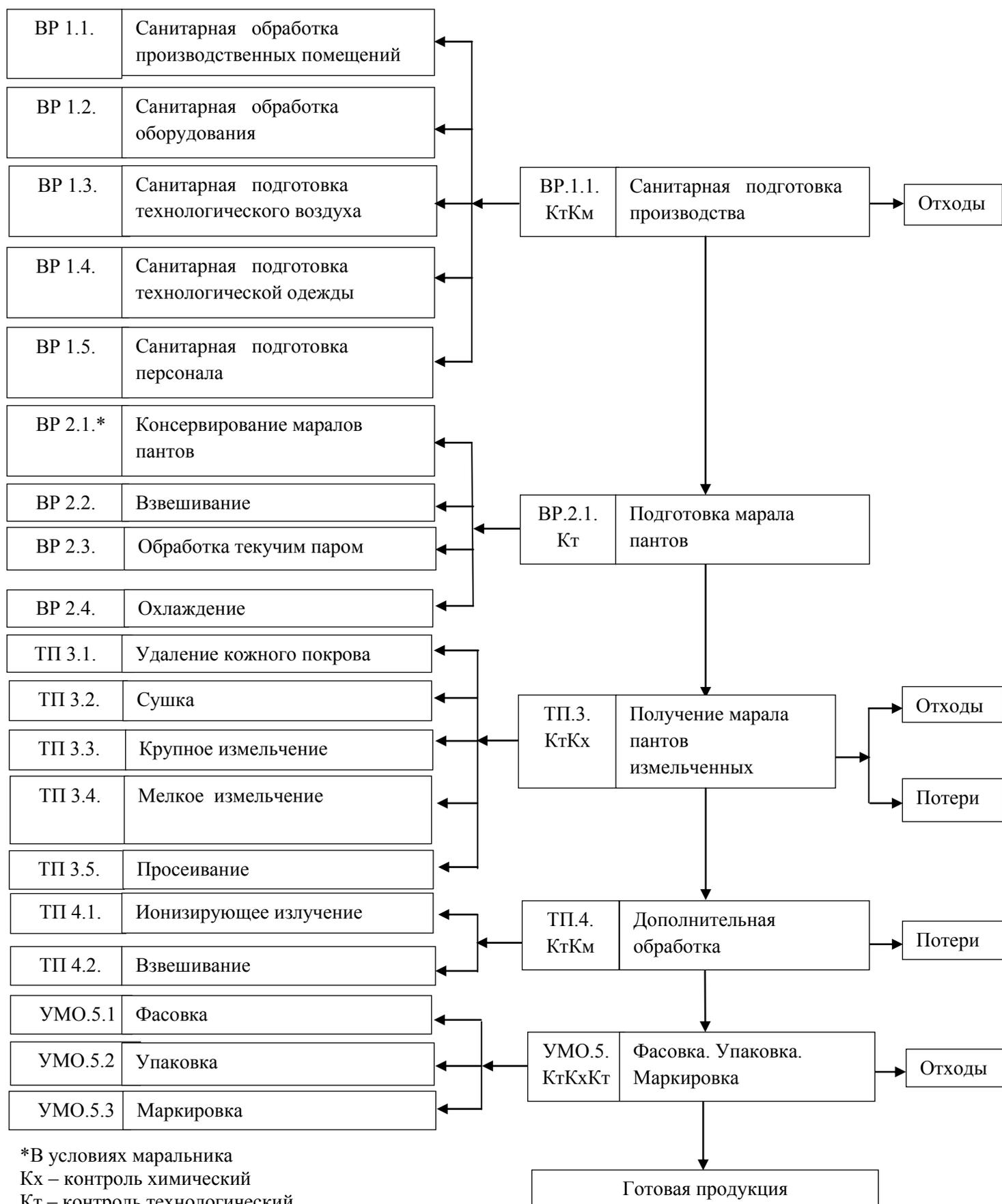


Рис. 4.3. Технологическая схема получения марала пантов измельченных

4.5. Стандартизация марала пантов измельченных

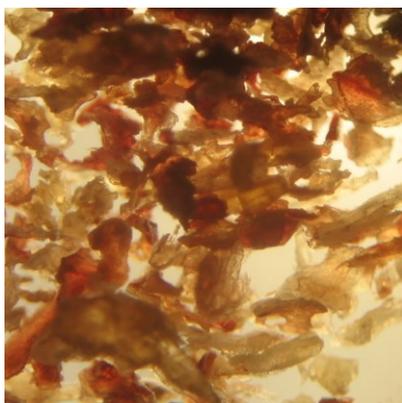
По разработанной технологии было получено 5 серий МПИ и проведена их оценка качества по показателям: описание, потеря в массе при высушивании, зола общая, размер частиц, качественный состав и количественное содержание аминокислот и микробиологическая чистота.

Описание (внешний вид, цвет, запах) оценивали органолептически (раздел 2.4.1 и табл.4.1). Все серии марала пантов измельченных представляли собой однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом (рис.4.4).

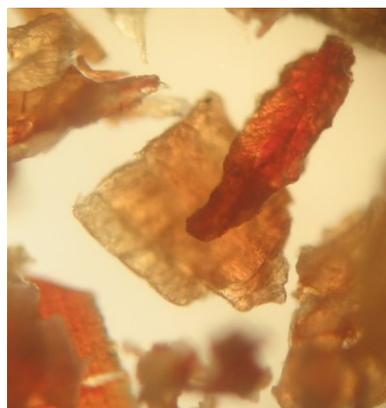


Рис. 4.4. Марала панты измельченные

При рассмотрении под бинокулярным микроскопом Микмед-6 (с увеличением в 100 и 400 раз) были дополнительно изучены цвет и форма частиц МПИ (рис. 4.5).



А



Б

Рис.4.5. Марала панты измельченные увеличение в: А - 100 раз, Б – 400 раз.

При микроскопическом исследовании видны частицы различной формы и размера, с неровными краями и различной окраской: бежевой, бурой и красно-коричневой.

Потерю в массе при высушивании МПИ определяли стандартным методом по методике ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании».

Установлено, потеря в массе при высушивании сырья варьирует в пределах от $6,67 \pm 0,07\%$ до $6,72 \pm 0,08\%$.

Золу общую МПИ определяли по методике ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая». Установлено, что зола общая исследуемого сырья варьирует от $33,40 \pm 0,05\%$ до $35,80 \pm 0,07\%$.

Размер частиц изучаемого сырья определяли ситовым анализом с помощью стандартного набора сит по методике ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.1.0015.15 «Ситовой анализ» (раздел 2.4.6). Установлено, что исследуемые серии марала пантов измельченных имеют неоднородный состав с преобладанием фракции от 0,2 до 0,3 мм (от 85,62% до 86,45%), при этом присутствуют фракции с размером частиц от 0,1 мм до 0,2 мм (от 12,30% до 12,83%), до 0,1 мм (от 0,75% до 1,87%), фракции более 0,3 мм отсутствовали.

Подлинность марала пантов измельченных оценивали по основной группе БАВ марала пантов - аминокислотам (глицин, аланин, пролин), с использованием валидированной нами методики ВЭЖХ, основанной на расщеплении пептидных связей белков фенилизотиоционатом и дальнейшем разделении полученных производных на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence («SHIMADZU», Япония) с УФ-детектором (разделы 2.2.2, 2.3). Данные проведенных нами исследований представлены на рис. 4.6.

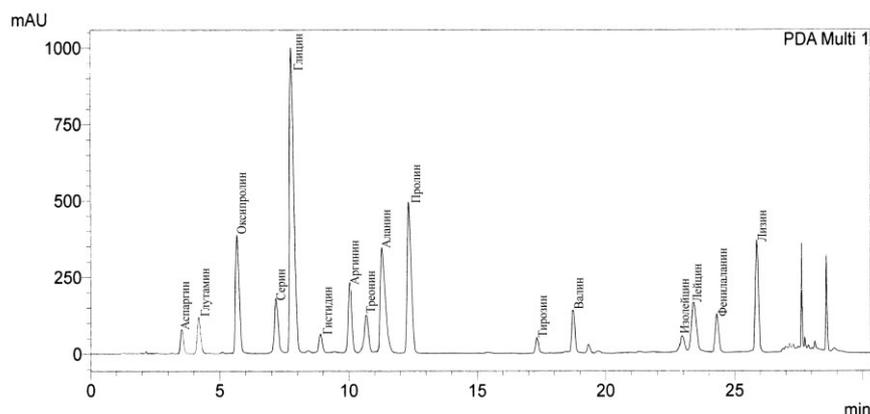


Рис.4.6. Хроматограмма аминокислот марала пантов измельченных

Анализ представленных данных (рис.4.7) позволяет сделать заключение, что исследуемые серии МПИ содержат 16 производных аминокислот, обнаруженных нами ранее в данном сырье (раздел 3.1), в том числе 3 основные аминокислоты МПИ такие как глицин, аланин, пролин.

Сравнительная оценка времен удерживания пиков основных аминокислот

исследуемых образцов МПИ и СО аминокислот представлена в табл. 4.4.

Таблица 4.4

Сравнительная оценка времен удерживания пиков СО аминокислот и основных аминокислот в марала пантах измельченных

№ серии	Время удерживания пика СО, мин	Время удерживания пика исследуемого образца, мин	Отклонение, %
<i>Глицин</i>			
1	7,82	7,79	0,38
2	7,82	7,81	0,12
3	7,82	7,82	0
4	7,82	7,81	0,12
5	7,82	7,84	0,25
<i>Аланин</i>			
1	11,31	11,33	0,18
2	11,31	11,34	0,26
3	11,31	11,33	0,18
4	11,31	11,35	0,35
5	11,31	11,36	0,44
<i>Пролин</i>			
1	12,39	12,43	0,32
2	12,39	12,44	0,40
3	12,39	12,44	0,40
4	12,39	12,39	0
5	12,39	12,43	0,32
Отклонение не более 0,5%			

Исследования показали, что время удерживания глицина варьирует от 7,79 до 7,84 мин, аланина от 11,33 до 11,36 мин и пролина от 12,39 до 12,44 мин. Стандартное отклонение между временем удерживания пиков СО глицина, аланина, пролина и соответствующих аминокислот исследуемых образцов не превышает 0,5%.

В основу количественного определения основных аминокислот таких, как глицин, пролин и аланин, была положена методика качественного обнаружения, т.к. обеспечивала хорошее разделение пиков (раздел 2.3).

Микробиологическая чистота. Определение микробиологической чистоты исследуемой серии марала пантов измельченных проводили на базе Барнаульского филиала ФГУ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту» согласно требований ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.4.0002.15

«Микробиологическая чистота» (раздел 2.4.10). Обобщенные данные стандартизации исследуемых серий МПИ представлены в табл.4.5.

Данные, приведенные в таблице 4.5, свидетельствуют о том, что все серии МПИ соответствуют требованиям, предъявляемым ГФ XIII изд. и разработанного нами проекта НД 42- «Марала панты измельченные» на основании материалов выполненных исследований (приложение 5).

4.6. Оценка стабильности марала пантов измельченных в условиях стресс-испытаний и прогнозирование сроков годности

Сложность в обеспечении стабильности МПИ в процессе изготовления и последующего хранения заключается в животном происхождении сырья и разнообразном химическом составе, включающем наряду с другими БАВ аминокислоты, белки, гормоны и ферменты, стабильность которых, в свою очередь, может зависеть от факторов окружающей среды [59]. Изучение стабильности проводили в условиях стресс-испытаний и в естественных условиях, согласно требований ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств» (раздел 2.4).

4.6.1. Оценка стабильности марала пантов измельченных в условиях стресс - испытаний

Влияние факторов окружающей среды на стабильность физико-химических показателей измельченных марала пантов в стресс-условиях. В данной серии экспериментов определение стабильности МПИ осуществляли на основании наличия или отсутствия изменений основных показателей качества (описание, потеря в массе при высушивании, качественный состав и количественное содержание аминокислот (раздел 2.2, 2.3)), возникших в результате воздействия деструктирующих факторов: естественный солнечный свет; искусственный свет (линейная люминесцентная лампа Т8F18W/54-765 (54-765), мощность 18W); УФ - излучении (254 нм). Исследования проводили при относительной влажности воздуха $60 \pm 5 \%$ и комнатной температуре.

Дополнительно изучалось влияние повышенной температуры (70°C) при выдерживании сырья в сушильном шкафу марки СНОЛ – 3,5.3,5.3,5/3,5 – И1М. Кроме того, изучалась стабильность исследуемого сырья в условиях 100 % влажности воздуха. Образцы выдерживали в течение 48 ч в открытых бюксах при относительной

Основные показатели качества марала пантов измельченных

№ сери и	Описание	Подлинность ВЭЖХ (глицин, аланин, пролин)	Количественное содержание, %			Размер частиц порошка, мм	Потеря в массе при высуши- вании, %	Зола общая, %	Микробиол- огическая чистота
			глицин	аланин	пролин				
1	Однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом. Под микроскопом (увеличение в 100 раз) видны частицы различной формы, красно-коричневого цвета с серыми включениями костно-хрящевой ткани.	На хроматограмме наблюдаются 16 пиков производных аминокислот, в том числе три пика с временем удерживания ($\tau=7,81; 11,34; 12,42$), которые соответствуют пиками СО глицин, аланин, пролин ($SD < 0,5\%$)	6,35±0,16	2,30±0,03	4,76±0,09	Не более 0,3	6,67±0,07	33,40±0,05	Категория ЗБ
2	То же	То же	6,39±0,15	2,45±0,10	4,54±0,08	То же	6,72±0,08	35,80±0,07	То же
3	То же	То же	7,11±0,08	2,19±0,07	4,12±0,03	То же	6,31±0,19	32,35±0,39	То же
4	То же	То же	6,37±0,16	2,61±0,06	4,32±0,09	То же	6,28±0,09	33,89±0,63	То же
5	То же	То же	5,88±0,09	2,76±0,06	4,38±0,07	То же	6,51±0,09	34,58±0,62	То же

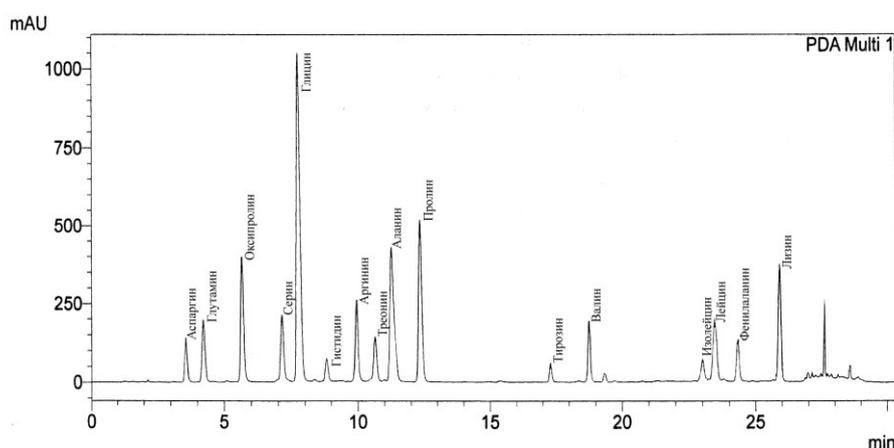
влажности воздуха 60 % и комнатной температуре, а также в герметичной камере при влажности воздуха 100%.

Методики исследования вышеперечисленных показателей были аналогичны (раздел 4.1).

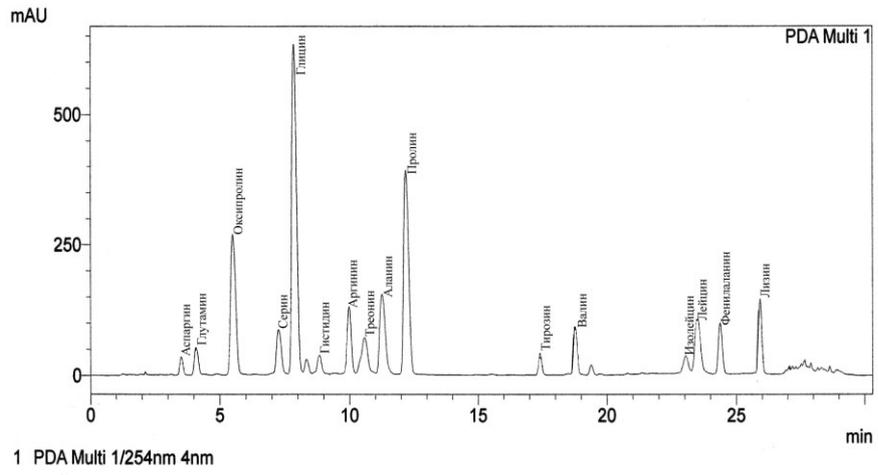
Исследуемые серии МПИ массой по 0,5 г (т.н.) помещали в бьюксы (толщина стенок не более 3 мм), закрывали крышкой и содержимое подвергали принудительной деградации под воздействием вышеуказанных факторов в течение 48 часов.

Описание и «потеря в массе при высушивании». Результаты исследований по изучению влияния вышеперечисленных факторов на внешний вид исследуемого сырья показали, что естественный дневной и искусственный свет, УФ - излучение и повышенная температура не влияют на внешний вид МПИ. Естественный дневной и искусственный свет, УФ - излучение и повышенная температура также не влияют на показатель «потеря в массе при высушивании» МПИ, который составил $6,32 \pm 0,06\%$, $6,42 \pm 0,02\%$, $6,51 \pm 0,05\%$ и $6,57 \pm 0,05\%$ соответственно. Только выдерживание сырья в условиях 100% относительной влажности воздуха приводит к его комкованию (показатель «потеря в массе при высушивании» изменялся от $6,67 \pm 0,07\%$ до $10,24 \pm 0,10\%$).

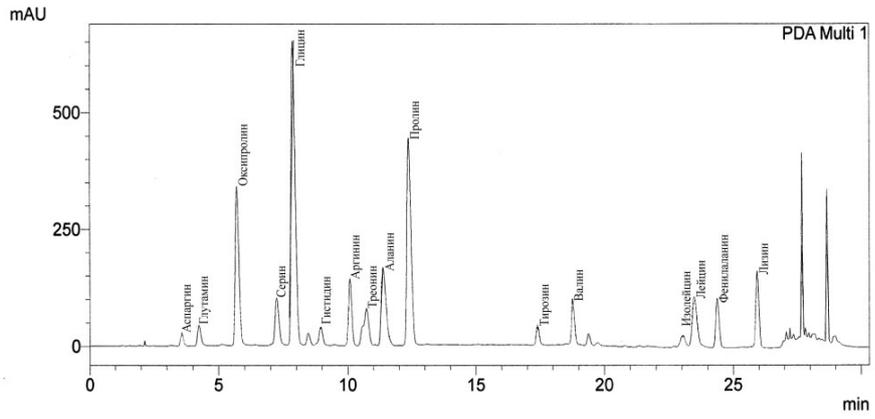
Качественный анализ МПИ. Результаты исследований по изучению влиянию вышеперечисленных факторов в «стресс-условиях» на качественный состав аминокислот МПИ представлены на рис. 4.7.



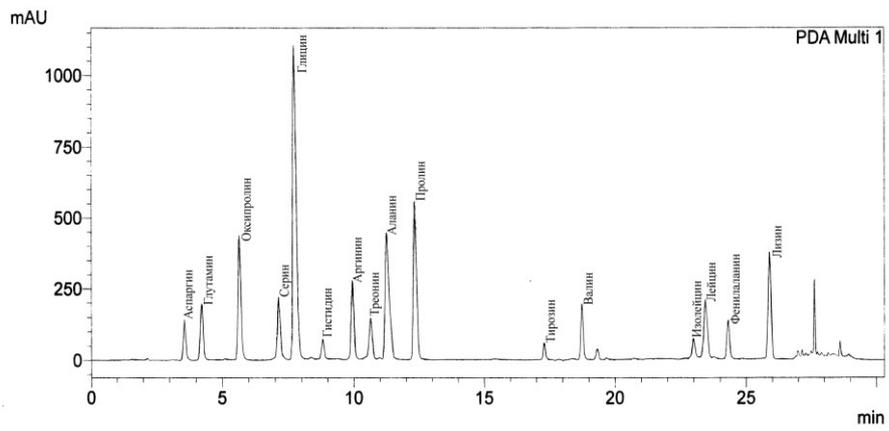
А



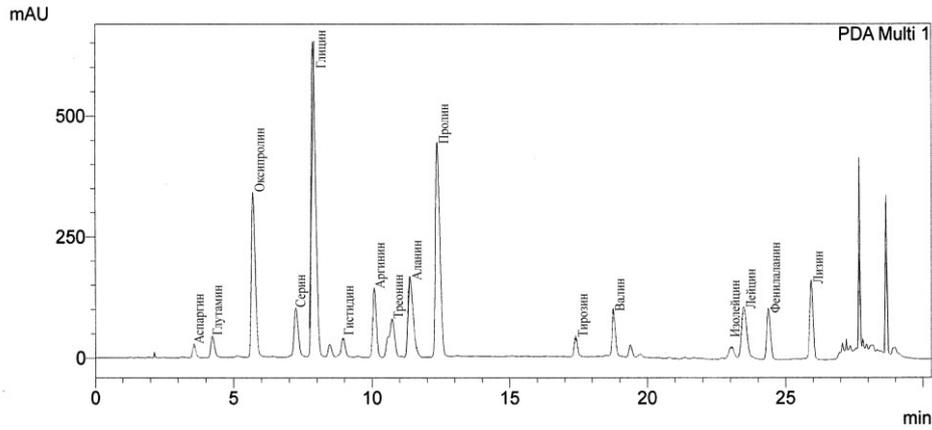
Б



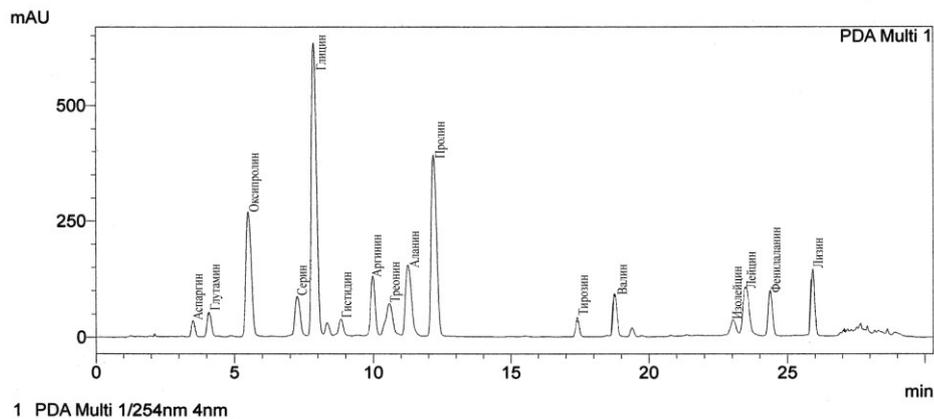
В



Г



Д



Е

Рис. 4.7. Хроматограммы аминокислот марала пантов измельченных до и после воздействия деструктурирующих факторов: А - до воздействия; Б - естественный дневной свет; В - искусственный свет; Г - УФ - излучение, 254 нм; Д - повышенная температура - 70°C; Е - относительная влажность 100%.

Сравнительная оценка аминокислотного состава МПИ, не подвергшихся воздействию, и после воздействия вышеуказанных физических факторов, указывает на идентичность аминокислотного состава всех изучаемых образцов и отсутствие их влияния на качественный состав аминокислот.

Количественный анализ. Результаты испытания фотостабильности, что является неотъемлемой частью «стресс-исследований», по количественному содержанию основных аминокислот МПИ представлены в табл. 4.6.

Таблица 4.6

Сравнительная оценка количественного содержания основных аминокислот в марала пантах измельченных до и после воздействия различных видов излучения

№ п/п	Наименование аминокислоты	Содержание аминокислот, %			
		До воздействия излучения	Свет		УФ – излучение, длина волны 254нм
			Естествен- ный	Искусствен- ный	
1	Глицин	6,35 ±0,16	4,81 ± 0,22	4,80 ± 0,23	6,13 ± 0,21
2	Аланин	2,30 ±0,03	1,29 ±0,02	1,72 ± 0,06	2,20 ±0,06
3	Пролин	4,76 ±0,09	4,16 ±0,19	4,48 ± 0,13	4,34 ±0,20

Сопоставление содержания аминокислот в МПИ до и после воздействия различных видов излучения указывает на то, что УФ – излучение при длине волны 254 нм практически не оказывает влияние на их количественное содержание. В отличие от этого, после воздействия как естественного солнечного, так и искусственного света, отмечено значительное снижение содержания глицина (23,6%) и аланина (43,9% и 25% соответственно). Наибольшая стабильность к воздействию всех изучаемых факторов выявлена у пролина, содержание которого при всех вариантах деструктирующего воздействия не изменилось.

Важной частью стресс-испытаний является исследование влияния повышенной влажности воздуха, результаты которого представлены в табл. 4.7.

Таблица 4.7

Изменение содержания аминокислот в марала пантах измельченных под воздействием влажности воздуха

№ п/п	Наименование аминокислоты	Содержание аминокислот, %	
		До «стресс-испытаний» (относительная влажность воздуха 60%)	Относительная влажность воздуха 100%
1	Глицин	6,35 ±0,16	5,54 ± 0,12
2	Аланин	2,30 ±0,03	1,25 ± 0,01
3	Пролин	4,76 ±0,09	4,15 ± 0,13

Результаты эксперимента указывают на то, что повышение влажности воздуха приводит к снижению содержания всех изучаемых аминокислот. Следует отметить, что под воздействием данного физического фактора происходит максимальное уменьшение содержания аланина на 45,6%.

Учитывая тот факт, что зависимость между температурой и скоростью химических реакций лежит в основе не только ускоренного хранения лекарственных средств, но и «стресс - испытаний», в ходе дальнейших исследований МПИ подвергали воздействию одного из основных факторов, вызывающих деструкцию БАВ, повышенной температуры - 70°С (табл. 4.8).

Таблица 4.8

Сравнительная оценка содержания аминокислот в пантах марала измельченных при воздействии различных температур

№ п/п	Наименование аминокислоты	Содержание аминокислот, %	
		До «стресс-испытания» (t= 15-25 °С)	t= 70 °С
1	Глицин	6,35 ± 0,16	5,22 ± 0,21
2	Аланин	2,30 ± 0,03	1,61 ± 0,07
3	Пролин	4,76 ± 0,09	3,33 ± 0,20

Сопоставление полученных данных свидетельствует о значительном снижении содержания всех аминокислот в МПИ под воздействием повышенной температуры. Отмечено уменьшение количественного содержания глицина, аланина и пролина на 17,5 %, 30,0% и 29,7 % соответственно.

Таким образом, в результате исследований по изучению влияния факторов окружающей среды, на стабильность физико-химических показателей МПИ в стресс-условиях установлено, что воздействие естественного дневного и искусственного света, а также повышенной влажности воздуха и температуры приводит к снижению количественного содержания аминокислот при сохранении их качественного состава. Полученные данные следует учитывать при организации технологического процесса получения и хранения МПИ.

4.6.2. Прогнозирование сроков годности марала пантов измельченных

Долгосрочные испытания стабильности марала пантов измельченных и прогнозирование сроков годности проводили согласно требований ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств» (раздел 2.4). С целью установления срока годности 5 серий МПИ были заложены на естественное хранение в защищённое от света место (относительная влажность воздуха не более 60%), при температуре от 15-25 °С. Анализ исследуемого сырья проводили каждые 6 месяцев по показателям, предлагаемым для оценки качества МПИ (приложение 3). Проведенные

эксперименты показали, что показатели качества исследуемых серий МПИ или не изменялись, или находились в пределах ошибки опыта в течение 1,5 лет. В результате исследований был установлен предварительный срок годности МПИ равный 1 году. Исследования стабильности сырья продолжаются.

4.7. Определение острой токсичности и общетонизирующей активности марала пантов измельченных

4.7.1. Определение острой токсичности марала пантов измельченных

Изучение острой токсичности марала пантов измельченных проводили согласно «Методическим указаниям по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [97] на белых мышах (массой 20-24г), полученных из вивария Института цитологии и генетики СО АН РФ и прошедших карантин 14 суток. Содержание экспериментальных животных осуществлялось в стандартных условиях вивария на обычном рационе при свободном доступе к воде и пище, в условиях нормального температурного и светового режимов (раздел 2.5). Животные были разделены на 6 групп по 10 мышей (самок) в каждой. Выбор доз обусловлен не растворимостью МПИ в воде и максимально технической возможностью введения мышам исследуемого сырья.

Первую серию исследуемой субстанции получала первая группа мышей перорально с пищей (хлебный шарик размером 1см³, смешанный с исследуемой пробой) однократно в течение суток в дозе 2500 мг/кг; вторая группа мышей – в дозе 5000 мг/кг.

Вторую серию исследуемой субстанции получала третья группа мышей перорально с пищей (хлебный шарик размером 1см³, смешанный с исследуемой пробой) однократно в течение суток в дозе 2500 мг/кг; четвертая группа мышей – в дозе 5000 мг/кг.

Третью серию исследуемой субстанции получала пятая группа мышей перорально с пищей (хлебный шарик размером 1см³, смешанный с исследуемой пробой) однократно в течение суток в дозе 2500 мг/кг; шестая группа мышей – в дозе 5000 мг/кг. Общая продолжительность наблюдения составляла 14 дней. В первый день мыши находились под постоянным наблюдением. Общее состояние животных в течение опыта оценивали с учетом изменения координации движений, поведенческих реакций,

дыхательной функции, нервно-мышечной возбудимости, также измеряли массу тела до получения исследуемой субстанции и после окончания наблюдения (раздел 2.5.).

В результате проведенных исследований установлено, что при пероральном введении МПИ в максимально возможных при введении дозах (2500 мг/кг, 5000 мг/кг) симптомы острого отравления отсутствовали. В последующие дни все животные были активны, обладали нормальной координацией движений, стандартной реакцией на внешние раздражители, обычной частотой и глубиной дыхательных движений, нормальной консистенцией фекальных масс, частотой мочеиспускания и окраской мочи, имели хороший аппетит и нормальный внешний вид. За время эксперимента животные прибавили в массе тела (табл. 4.9).

Таблица 4.9

Изменение массы тела экспериментальных животных при определении острой токсичности марала пантов измельченных (M±m)

Серия марала пантов измельченных	Серия 1		Серия 2		Серия 3	
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5	Группа 6
Испытуемые дозы, мг/кг	2500	5000	2500	5000	2500	5000
Масса животных до введения препарата, г	20,25± 0,70	23,54 ± 0,79	20,86 ± 0,69	22,68± 0,56	20,42± 0,82*	23,05± 0,60
Масса животных на 14-е сут. наблюдения, г	24,35± 0,45*	27,42± 0,88*	24,35± 0,77*	24,68± 0,63*	23,96±0,7 2*	25,82± 0,75
Прирост массы тела, г	4,30± 0,70	2,90± 0,30*	2,20± 0,92*	1,47± 0,75*	3,96± 0,81*	1,60± 0,69*

Примечание: * различия статистически значимы ($p < 0,05$)

Результаты опытов не позволили определить ЛД₅₀ изучаемого препарата, так как в течение 14 суток эксперимента гибели животных не было отмечено, вследствие чего МПИ отнесены к IV классу опасности (малоопасные вещества) согласно ГОСТ 12.1.007-76 [22]. На основании полученных результатов исследуемое сырье можно считать нетоксичным в испытанном диапазоне.

4.7.2. Определение общетонизирующей активности марала пантов измельченных

Определение общетонизирующей активности МПИ осуществляли согласно «Методике оценки выносливости мелких лабораторных животных для изучения

адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов», предложенной Каркищенко В.Н. с соавт. (раздел 2.5.6).

Эксперименты проводили на сертифицированных самках крыс (массой 190 -220г), полученных из вивария Института цитологии и генетики СО АН РФ и прошедших 14 -дневный карантин. Содержание экспериментальных животных осуществлялось в стандартных условиях вивария на обычном рационе при свободном доступе к воде и пище, в условиях естественного освещения и температуре 20-22°C (раздел 2.5).

Животные были разделены на 3 группы: контрольная и две экспериментальных. Контрольная группа крыс ежедневно получала плацебо в виде хлебного шарика объемом 1см³, начиная с третьего дня эксперимента. Животные первой экспериментальной группы получали такие же шарики, смешанные с исследуемыми образцами марала пантов измельченных в дозе 200 мг/кг один раз в сутки, животные второй группы получали препарат сравнения «Пантокрин» в дозе 1 мл/кг.

В первый день эксперимента крысы всех групп запускались в емкость с водой при температуре 27 - 29°C и грузом 10% от массы тела без получения исследуемых образцов. Аналогичным образом животные помещались в воду на 3 и 7 день эксперимента через один час после получения плацебо или исследуемых образцов марала пантов.

При наблюдении за животными фиксировалось время их нахождения в воде до момента, когда животные были уже не в состоянии удерживаться над поверхностью воды самостоятельно и начинали тонуть. Этот момент являлся точкой окончания эксперимента.

Процесс тренировки привел к тому, что на третий день длительность плавания крыс контрольной группы была достоверно выше, чем в исходном периоде, превысив его значение на 8,2% ($p < 0,05$). Данная тенденция сохранилась и в последующие дни. Плавание, проведенное на 7 день после начала эксперимента, продемонстрировало удлинение пребывания животных контрольной группы в воде уже на 13,8% ($p < 0,05$).

При применении исследуемых образцов был зафиксирован более длительный период плавания крыс. При этом наблюдавшийся эффект тренировки превосходил по времени выше отмеченную тенденцию в контрольной группе. Сравнив эффект тренировки контрольной группы крыс и при применении исследуемых образцов марала пантов, условно рассчитали их эффективность.

На третий день эксперимента длительность плавания крыс первой экспериментальной группы была выше, чем в исходном периоде, превысив его значение на 13,1% ($p < 0,05$), второй группы на 10,3% ($p < 0,05$).

Следует отметить, что на третий день эксперимента в контрольной группе длительность плавания крыс увеличилась на 8,2% ($p < 0,05$), а при применении исследуемых МПИ - на 13,1% ($p < 0,05$), Пантокрин - на 11,7%, разницу в обнаруженных эффектах (4,9% и 3,5% соответственно) можно отнести к специфическому действию исследуемого сырья и препарата сравнения.

На седьмой день в контрольной группе длительность плавания животных увеличилась на 13,8% ($p < 0,05$), при применении исследуемых МПИ - на 23,5% ($p < 0,05$), Пантокрин - на 19,1%, разницу в обнаруженных эффектах (9,7% и 5,3% соответственно) можно отнести к специфическому действию исследуемого сырья и препарата сравнения.

Результаты проведенного исследования показали, что в условиях приема марала пантов измельченных существенно повышается выносливость крыс, превышающая результаты, достигаемые в условиях обычной тренировки и после применения препарата сравнения. В наибольшей степени эффект проявляется на 7 день эксперимента. Полученные данные подтверждают наличие общетонизирующей активности марала пантов измельченных.

Выводы по главе

1. Установлено, что дополнительная термическая обработка (60°C, 240 мин), а также обработка УФ - излучением (при длине волны 254 нм, 180 мин и 360 мин) и СВЧ - излучением (микроволновая печь мощностью 700 Вт, 0,7 мин) не обеспечивают требуемую микробиологическую чистоту марала пантов измельченных. Сырье, обработанное ионизирующим излучением и спиртом этиловым 70% и 90% , соответствует требованиям ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» (категория 3.Б). Экономически целесообразным и более выгодным является применение ионизирующего излучения.

2. Доказано, что марала панты измельченные до и после обработки ионизирующим излучением (10 кГр, 0,3 мин), имеют одинаковый качественный и количественный состав аминокислот, характерный для исходного сырья. Исследования,

проведенные на лабораторных животных, позволяют утверждать, что марала панты измельченные после обработки ионизирующим излучением сохраняют общетонизирующую активность в дозе 200 мг/кг.

3. На основе экспериментальных данных разработана рациональная технология получения марала пантов измельченных с включением стадий отсева фракций размером более 0,3 мм и дополнительной обработкой ионизирующим излучением. Марала панты измельченные, полученные по разработанной технологии, соответствуют требованиям ГФ XIII изд. и проекта нормативной документации по показателям описание, подлинность (на хроматограмме 16 пиков производных аминокислот в том числе три пика с $\tau=7,81$ мин глицин, $\tau=1,34$ мин аланин, $\tau=12,42$ мин пролин), количественное содержание аминокислот: глицин не менее 5%, аланина не менее 2%, пролина не менее 4%), размер частиц (не более 0,3 мм, фракции 0,1 мм не более 2%), потеря в массе при высушивании (не более 7%), зола общая (не более 36%), микробиологическая чистота (категория 3Б).

4. В результате исследований по изучению влияния факторов окружающей среды, на стабильность физико-химических показателей марала пантов измельченных в стресс-условиях установлено, что воздействие естественного дневного и искусственного света, а также повышенной влажности воздуха (100%) и температуры (70°C) приводит к снижению количественного содержания аминокислот (от 17% до 45%) при сохранении их качественного состава, что следует учитывать при организации хранения марала пантов измельченных.

5. Показатели качества марала пантов измельченных или не изменялись, или находились в пределах ошибки опыта в условиях естественного хранения при относительной влажности воздуха не более 60% и температуре 15-25 °C в течение 1,5 лет. Рекомендуемый предварительный срок годности марала пантов измельченных равен 1 году.

6. Марала панты измельченные согласно ГОСТ 12.1.007-76 относятся к IV классу опасности (малоопасные вещества), т.к. при изучении острой токсичности изучаемого препарата при энтеральном введении мышам (2500-5000 мг/кг) симптомов отравления не наблюдалось, летальность отсутствовала, что не позволило установить ЛД₅₀.

7. Исследования, проведенные на лабораторных животных, позволяют утверждать, что марала панты измельченные, полученные по разработанной технологии, обладают общетонизирующей активностью в дозе 200 мг/кг.

Результаты проведенных исследований (Глава 4) отражены в публикациях:

1. Земцова, Н. П. Сравнительная оценка эффективности измельченных пантов марала и крови марала высушенной / Н. П. Земцова, К. П. Лунин, Я. Ф. Зверев, В. Ф. Турецкова // Сборник материалов V Юбилейной Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 20-21 апреля 2015 г.). – Санкт-Петербург, 2015. – С. 416–418.

2. Земцова, Н. П. Влияние курсового введения измельченных пантов марала на адаптогенную активность у крыс / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова, Я. Ф. Зверев // Теоретические и прикладные аспекты современной науки: сборник науч. трудов по материалам VIII Междунар. науч.-практ. конф. 27 февр. 2015 г.: в 7 ч. / под общ. ред. М. Г. Петровой. – Белгород, 2015. – Ч. I. – С. 112–115.

3. Земцова, Н. П. Проблемы и перспективы совершенствования оценки качества препаратов на основе пантов марала / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Продукция на основе сырья пантового оленеводства. Актуальные проблемы и перспективы ее использования в медицине и спорте высших достижений: материалы I Междисциплинар. конгресса, 10 сент. 2015 г. (г. Барнаул) / [науч. ред.: Б. И. Козлов, Н. А. Фролов]. – Бийск; Барнаул, 2015. – С. 23–26.

4. Земцова, Н. П. Перспективы применения продуктов пантового оленеводства в спортивной медицине / Н. П. Земцова, К. П. Лунин, В. Ф. Турецкова // Беликовские чтения: материалы IV Всерос. науч.-практ. конференции (Пятигорск, 1-2 дек. 2015г.). – Пятигорск, 2015. – С. 65–66.

5. Земцова, Н. П. Влияние дополнительной обработки на показатели качества измельченных пантов марала / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова // Современные тенденции развития науки и технологий: по материалам X Междунар. науч.-практ. конференции (г. Белгород, 31 янв. 2016): период. науч. сборник / редкол.: Н. А. Духно, Ф. П. Васильев, З. Г. Алиев. – Белгород, 2016. – № 1-3. – С. 43–46.

6. Земцова, Н. П. Стабильность измельченных пантов марала в условиях стресс-испытаний / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова, О. Г. Макарова // Фармация. – Москва, 2016. – № 8. – С. 25–27.

7. Земцова, Н. П. Изучение влияния способов дополнительной обработки измельченных пантов марала на общетонизирующую активность / Н. П. Земцова, В. Ф. Турецкова, Я. Ф. Зверев // Современные достижения фармацевтической науки в

создании и стандартизации лекарственных средств и диетических добавок, которые содержат компоненты природного происхождения: материалы I Междунар. науч.-практ. интернет-конференции, (Харьков, 5 апреля 2018 г.): тезисы. – Харьков, 2018. – С. 49–50. – Текст парал. на укр. и рус. языках.

ГЛАВА V. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ КАПСУЛ «ПАНТОКАП», СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ

Одной из оптимальных лекарственных форм для МПИ, являются капсулы. Указанная лекарственная форма, по сравнению с классическими таблетками требует меньше вспомогательных веществ и технологических стадий (в том числе и меньших чистых помещений, единиц оборудования, производственного персонала, инвестиций). Кроме того, капсула защищает содержимое от влияния окружающей среды, улучшает органолептические свойства и обеспечивают более быстрое высвобождение активного компонента из-за меньшего влияния фармацевтических факторов на данный процесс [3].

Как указывалось выше, в последние годы коммерческими фирмами Алтая предложен широкий ассортимент пищевых и БАД на основе измельченных пантов в виде капсул с использованием различных вспомогательных и БАВ. При этом рекомендуемая разовая доза МПИ в выпускаемых БАД варьирует и находится в пределах от 50 мг до 200 мг, биологическая активность исходного сырья и конечного продукта не определяется. Кроме того, отсутствуют исследования по разработке оптимального состава вспомогательных веществ капсулируемых препаратов (раздел 1).

Вышеизложенное явилось основанием для проведения исследований по определению общетонизирующей активности МПИ в различных дозах и разработке на их основе капсул, которые получили условное название «Пантокап».

5.1. Определение общетонизирующей активности марала пантов измельченных в различных дозах

Эксперименты по изучению зависимости общетонизирующей активности МПИ от применяемой дозы (50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг) проводили на сертифицированных половозрелых самках крыс (массой 180-200г), полученных из вивария Института цитологии и генетики СО АН РФ и прошедших 14-дневный карантин. Содержание экспериментальных животных осуществлялось в стандартных условиях вивария на обычном рационе при свободном доступе к воде и пище, в условиях естественного освещения и температуре 20-22°C (раздел 2.5).

Животные были разделены на 4 группы, исходя из показателей массы тела и исходного уровня плавания. Крысы контрольной группы ежедневно получали плацебо в виде хлебного шарика объемом 1см³. Животные первой, второй и третьей

экспериментальных групп получали такие же шарики, смешанные с исследуемыми образцами измельченных марала пантов в дозах: 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг один раз в сутки в течение 12 суток.

Животные с грузом 10% от массы тела групп запускались в емкость с водой при температуре 27-29°C на 2 и 6 день эксперимента через один час после получения плацебо или исследуемых образцов марала пантов.

При наблюдении за крысами фиксировалось время их нахождения в воде до момента, когда они были не в состоянии удержаться над поверхностью воды самостоятельно и начинали тонуть. Этот момент являлся точкой окончания эксперимента.

В ходе эксперимента наблюдался процесс тренировки животных контрольной группы, который выражался в увеличении времени их нахождения в воде. На 2 день эксперимента длительность плавания крыс контрольной группы была достоверно выше, чем в исходном уровне, превысив данный показатель на 7,8% ($p < 0,02$). Данная тенденция сохранилась и в последующие дни. Показатель удлинения пребывания в воде последовательно возрастал, превосходя контрольные цифры на 6 день эксперимента на 25,5% ($p < 0,05$) (табл.5.1).

Таблица 5.1

Влияние пантов марала измельченных на время плавания крыс

Доза препарата, мг/кг	Исх. уровень плавания	2 день эксперимента		6 день эксперимента	
	Продолжительность времени плавания				
	Мин.	Мин.	Прирост, %	Мин.	Прирост, %
Группа контроля	5,1±0,12	5,5±0,08* ($p < 0,02$)	7,8	6,4±0,15* ($p < 0,05$)	25,5
50 мг/кг	11,2±0,27	13,1±0,19*	16,3	19,7±0,39*	74,8
100 мг/кг	15,6±0,30	18,8±0,64*	20,5	29,4±0,46*	88,5
200 мг/кг	14,8±0,34	18,4±0,41*	24,3	23,9±0,55*	61,5

Примечание: звездочками (*) обозначены достоверные изменения внутри каждой группы по отношению к исходным показателям ($p < 0,05$)

При применении исследуемых образцов в различных дозах был зафиксирован более длительный период плавания крыс. При этом наблюдавшийся эффект тренировки превосходил по времени выше отмеченную тенденцию в контрольной группе. Сравнив

эффект тренировки контрольной группы крыс и при применении исследуемых образцов марала пантов, условно нами была рассчитана их эффективность.

В группе крыс, получавшей МПИ в дозе 50 мг/кг уже на 2 день время пребывания в воде достоверно ($p < 0,05$) увеличилось на 16,3%. К окончанию эксперимента данная тенденция сохранялась, при этом увеличение по сравнению с исходным уровнем плавания составило 74,8%. Сравнив результаты тренировки контрольной и экспериментальной групп, разницу в обнаруженных эффектах (8,5% и 49,3% соответственно) можно отнести к специфическому действию исследуемой серии пантов.

Так, при применении исследуемых образцов МПИ в дозе 100мг/кг прирост времени плавания на 2 день составил уже 20,5%, на 6 день – наблюдалось максимальное увеличение нахождения животных в воде – на 88,5% по сравнению с исходным уровнем плавания. Отмечено, что при получении животными ИПМ в дозе 100мг/кг данный показатель на 6 день эксперимента являлся максимальным. Рассчитав аналогичным образом прирост времени плавания экспериментальной и контрольной групп, разницу в обнаруженных эффектах (12,7% и 63%) можно отнести к действию МПИ в дозе 100 мг/кг.

При исследовании измельченных марала пантов в самой высокой дозе (200 мг/кг) отмечено, что длительность плавания уже на 2 день оказалось значительно выше, чем в контрольной группе и составила 24,3%. Сроки пребывания крыс в воде на 6 день были также выше, чем в контрольной группе (увеличение на 61,5%). Таким образом, разницу в обнаруженных эффектах (36%) можно отнести к действию образцов в дозе 200 мг/кг.

Сопоставление действия исследуемых субстанций в различных дозах свидетельствует о выраженном проявлении общетонизирующей активности у изученных образцов марала пантов. При этом существенной зависимости выраженности фармакологического эффекта от диапазона использованных дозировок выявлено не было. На основании полученных результатов установлено, что максимальные значения как абсолютных, так и относительных величин наблюдались на 6 сутки эксперимента в дозе 100 мг/кг.

5.2. Изучение технологических свойств марала пантов измельченных

Для разработки рациональной технологии препарата на основе МПИ в виде капсул особое значение имеют следующие технологические свойства

инкапсулируемой массы: фракционный состав, степень сыпучести, потеря в массе при высушивании и гигроскопичность [3].

Размер частиц (фракционный состав) изучаемого сырья определяли ситовым анализом с помощью стандартного набора сит (диаметр отверстий 2,0, 1,0, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 и 0,1 мм) по методике ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.1.0015.15 «Ситовой анализ» раздел 2.4.). Результаты исследований представлены в табл.5.2.

Таблица 5.2

Фракционный состав марала пантов измельченных после отсева

Размер частиц, мм	Доля фракций в общей массе образца, %
> 0,2 < 0,3	82,64
> 0,1 < 0,2	15,82
< 0,1	1,54

Установлено, что исследуемая серия МПИ имеет неоднородный состав с преобладанием фракции от 0,2 до 0,3 мм (82,64%), при этом присутствовали фракции от 0,1 мм до 0,2 мм (15,82%) и пылевидная фракция до 0,1 мм (1,54%).

Степень сыпучести. Сыпучесть МПИ определяли стандартным методом по методике ГФ XIII изд., Том 2, ОФС.1.4.2.0016.15 «Степень сыпучести порошков» по наиболее распространенным характеристикам: сыпучесть, угол естественного откоса и насыпной объем (раздел 2.4).

Сыпучесть и угол естественного откоса (угол между образующей конуса из сыпучего материала и горизонтальной плоскостью) определяли на приборе для снятия характеристик сыпучих материалов ВП-12А с воронкой без выходного ствола (раздел 2.4.1, 2.4.2).

Насыпной объем. При определении данного показателя определяли насыпные объемы до и после уплотнения, способность к уплотнению, а также насыпную плотность ИПМ. Испытание по определению насыпного объема проводили на устройстве для вибрационного уплотнения порошков 545Р-АК-3 (раздел 2.4.5).

Потеря в массе при высушивании определяли стандартным методом по методикам ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» (раздел 2.4.2).

Гигроскопичность (способность поглощать влагу) оценивали по методике

определения потери в массе при высушивании ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» после выдерживания бюкса с навеской в камере с относительной влажностью воздуха 100% в течение 24 часов.

Данные проведенных исследований позволили сделать заключение, что исследуемая серия МПИ обладает неудовлетворительной сыпучестью ($4,46 \pm 0,12$ г/сек, угол естественного откоса $47,10 \pm 0,15^\circ$); большим насыпным объемом ($0,769 \pm 0,015$ г/мл), относительно невысоким показателем потери массы при высушивании ($6,67 \pm 0,06\%$) и гигроскопичности ($12,36 \pm 0,01$).

Учитывая тот факт, что данные по неудовлетворительной сыпучести были получены на основании одного показателя указанного в ГФ XIII изд. (угол естественного откоса) были проведены более подробные расчеты. По значению насыпной плотности определяли степень сыпучести порошка. Для этого рассчитывали отношение Хауснера и индекс Карра по формулам, представленным в разделе 2.4. Согласно данным расчетам марала панты измельченные обладают очень хорошей сыпучестью: Индекс Хауснера $H=1,077$, Индекс Кара $I=7,15$.

5.3. Выбор состава прописи капсул «Пантокап»

Учитывая пожелания заказчика и исходя из особенностей оборудования данного предприятия, а также исходя из технологических свойств МПИ, принято решение изготовить твердые желатиновые капсулы с добавлением вспомогательных веществ, не ухудшающих сыпучесть сырья и снижающих гигроскопичность.

При разработке технологии была изучена возможность использования современных вспомогательных веществ (лудипресс и крахмал растворимый). Использование современного комбинированного полифункционального вспомогательного вещества лудипресса (раздел 2.1) основывалось на том, что он является уникальным компонентом, обладающим разрыхляющими и солюбилизующими свойствами, необходимыми в производстве капсул со средствами природного происхождения, имеющими сложный состав биологически активных веществ. Применение крахмала растворимого (раздел 2.1) обусловлено было тем, что он обладает хорошей растворимостью и по данным литературы также способствуют улучшению биодоступности лекарственных веществ [3].

Учитывая вышеизложенное, нами были разработаны и получены 2 прописи капсул с МПИ и указанными вспомогательными веществами (табл.5.3).

Состав прописей с марала пантами измельченными

№ прописи	Состав
1	Марала панты измельченные 0,2 Лудипресс 0,1
2	Марала панты измельченные 0,2 Крахмал растворимый 0,15

Выбор прописи проводили по таким показателям, как сыпучесть, угол естественного откоса, насыпная плотность, потеря в массе при высушивании и гигроскопичность. Данные показатели отображены в табл. 5.4.

Сравнительная оценка технологических свойств сопоставляемых прописей свидетельствует о том, что лудипресс незначительно улучшает сыпучесть от $4,46 \pm 0,12$ г/сек до $5,36 \pm 0,05$ г/сек (угол естественного откоса $46,20 \pm 0,14^\circ$), что свидетельствует о неудовлетворительной сыпучести прописи №1. Использование крахмала растворимого значительно улучшает сыпучесть (от $4,46 \pm 0,12$ г/сек до $6,63 \pm 0,06$ г/сек), уменьшает угол естественного откоса ($38,30 \pm 0,10^\circ$) и увеличивает насыпную плотность. При этом крахмал растворимый снижает гигроскопичность с $12,36 \pm 0,01\%$ до $7,30 \pm 0,01\%$, а лудипресс с $12,36 \pm 0,01\%$ до $10,94 \pm 0,08\%$ [27]. Оценка технологических характеристик исследуемого сырья и изучаемых прописей на основе МПИ по величине индексов Карра и Хауснера свидетельствуют об их очень хорошей текучести [25].

Сопоставление полученных данных по технологическим показателям изучаемых смесей, позволило сделать заключение о том, что наиболее рационально изготавливать капсулы с марала пантами измельченными по прописи № 2. Данная пропись обеспечивает высокие показатели индексов Карра и Хауснера, при этом согласно ГФ XIII изд. удовлетворительную сыпучесть ($6,63 \pm 0,06$ г/сек, угол естественного откоса $38,30 \pm 0,10^\circ$), более высокий показатель насыпной плотности,

Таблица 5.4

Сравнительная оценка технологических свойств изучаемых прописей с марала пантами измельченными

№ п/п	Сыпучесть, г/сек	Угол естественного откоса, °	Отношение Хауснера	Индекс Карра	Насыпная плотность, г/мл		Потеря в массе при высушива- нии, %	Гигроскопич- ность, %
					До уплотнения	После уплотнения		
Марала панты измельченные	4,46±0,12	47,10± 0,15	1,07	7,15	0,714±0,017	0,769±0,015	6,67±0,06	12,36±0,01
Пропись 1	5,36± 0,05	46,20±0,14	1,10	9,15	0,695±0,038	0,765±0,040	8,51± 0,07	10,94± 0,08
Пропись 2	6,63±0,06	38,30± 0,10	1,08	7,56	0,770±0,023	0,833±0,018	6,12± 0,02	7,30± 0,01

низкие показатели потери в массе при высушивании ($6,12 \pm 0,02\%$) и гигроскопичности ($7,30 \pm 0,01\%$), по сравнению с исходными показателями сырья.

Подбор размера твердых желатиновых капсул для выбранной прописи осуществляли исходя из средней вместимости капсул по таблице ГФ XIII изд.. Том 2, ОФС.1.4.1.005.15 «Капсулы».

Вместимость капсулы рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{m}{p}, \text{ где}$$

V – средняя вместимость капсулы, мл;

m – масса капсулируемой смеси, г;

p – насыпная плотность капсулируемой смеси, г/мл

Результаты по подбору номера твердых желатиновых капсул для капсулирования МПИ представлены в табл. 5.5.

Таблица 5.5

Выбор номера твердых желатиновых капсул для марала пантов измельченных

№ капсулы	Средняя вместимость капсулы, мл	Объем состава прописи № 2		Свободный объем капсулы, %
		мл	%	
000	1,37	–	–	–
00	0,95	–	–	–
0	0,68	–	–	–
1	0,50	0,45	90	10
2	0,37	–	–	–

Примечание: «–» показатель не определялся

Расчеты показали, что для капсулирования терапевтической дозы МПИ по прописи № 2 необходимо использовать капсулы № 1 (рис. 5.1).



Рис. 5.1. Капсулы с марала пантами измельченными

5.4. Разработка технологической схемы получения капсул «Пантокап»

Разработанная технология капсул с марала пантами измельченными, получивших условное название «Пантокап», заключалась в следующем: на стадии вспомогательных работ (ВР) включает в себя санитарную обработку производства. На данном этапе марала панты измельченные просеивали через сито с отверстиями до 0,3 мм. Крахмал растворимый просеивали через сито с отверстиями 0,3 мм. На стадиях основного технологического процесса (ТП) отдельно отвешивают марала панты измельченные и крахмал растворимый. В смеситель загружают сначала сырье, затем вспомогательное вещество, тщательно перемешивают. Капсулируемую смесь дозируют по 0,35 г в твердые желатиновые капсулы № 1 с помощью ручного объемного дозатора порошков ДПР-1, который обеспечивает достаточно плотную укладку порошка в капсулах. Фасуют в банки полимерные с винтовой горловиной. Упаковку производят в коробки картонные. На банки наклеивают этикетки утвержденной формы (приложение 10).

Результаты исследований положены в основу разработки технологической схемы получения капсул «Пантокап», которая содержит все традиционные этапы изготовления капсул и представлена на рисунке 5.2.

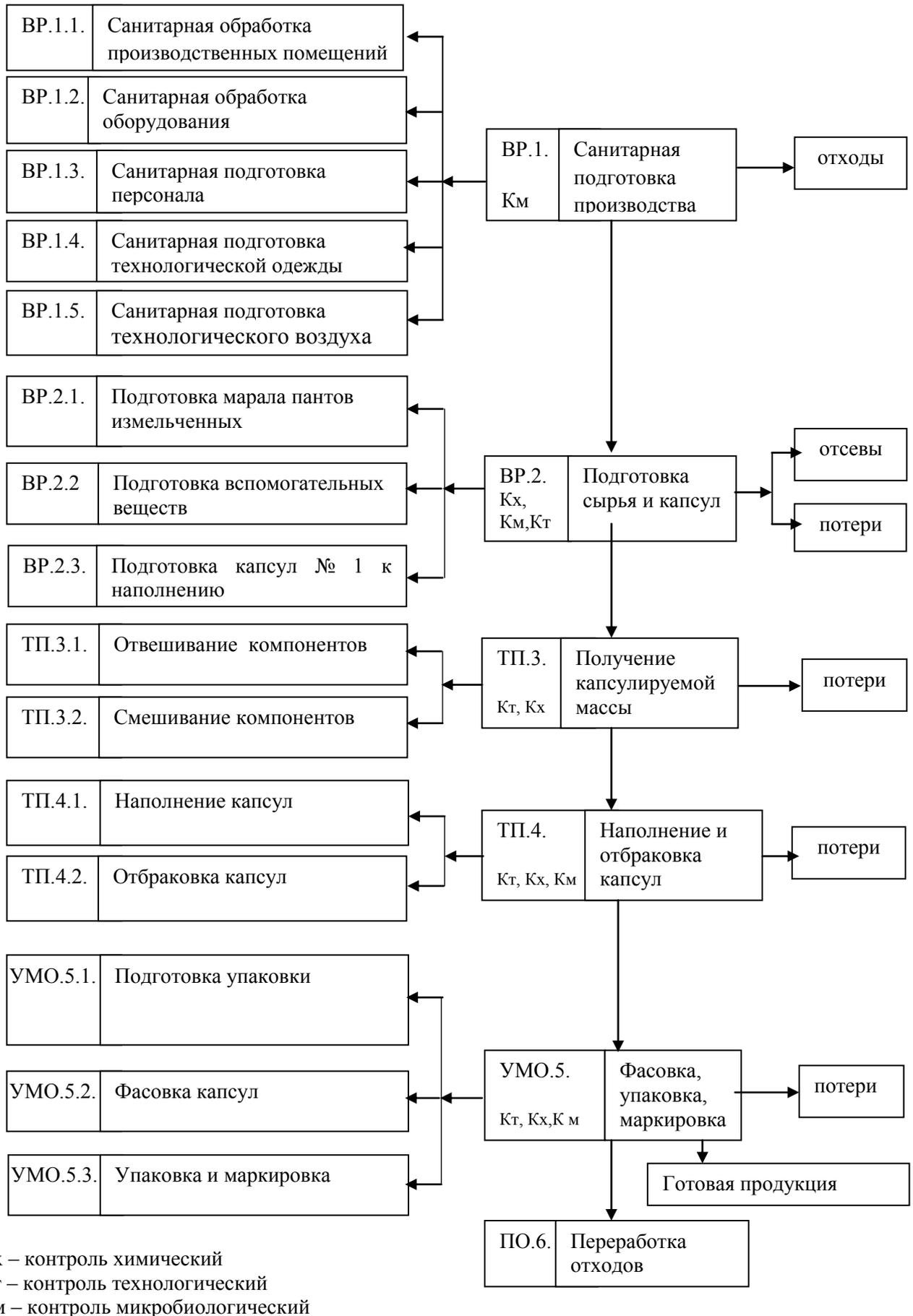


Рис. 5.2. Технологическая схема получения капсул «Пантокап»

Этап ВР. 1. Санитарная подготовка производства**ВР 1.1. Санитарная обработка производственных помещений**

Под подготовкой производственных помещений к работе подразумевается комплекс мероприятий, состоящий из влажной уборки, дезинфекции, УФ - облучения стен, полов и других поверхностей. Производственные помещения содержатся в соответствии с правилами санитарного режима в чистоте и надлежащем порядке. Перед началом технологического процесса все технологические помещения должны быть подготовлены к работе с использованием дезинфицирующих растворов.

ВР 1.2. Санитарная обработка технологического оборудования

Оборудование производственного участка расположено таким образом, что к нему обеспечен свободный доступ для проверки его чистоты и исправности согласно инструкциям по эксплуатации. Подготовка технологического оборудования заключается в обработке внутренних и наружных (частей) поверхностей моющими и дезинфицирующими средствами до и после технологического процесса. Контроль микробиологической обсемененности оборудования проводится непосредственно перед его использованием в производственном процессе, а также выборочно после его обработки.

ВР 1.3. Санитарная подготовка персонала

Персонал, который задействован в технологическом процессе, вспомогательных работах, упаковке и хранении, должен соблюдать инструкции предприятия, в которых отражены производственные задачи и область их ответственности, а также регламентирующие охрану здоровья и требования личной гигиены. Перед началом работы персонал надевает технологическую одежду, соответствующую выполняемым им производственным операциям.

Этап ВР 2. Подготовка сырья и капсул**ВР 2.1. Подготовка марала пантов измельченных**

Марала панты измельченные просеивали с использованием плоского сита (качающиеся или вибрационные) с отверстиями 0,3 мм.

ВР 2.2. Подготовка вспомогательных веществ (крахмал растворимый)

Крахмал растворимый просеивали с использованием плоского сита (качающиеся или вибрационные) с отверстиями 0,3 мм.

ВР 2.3. Подготовка капсул к наполнению

Подготовка капсул № 1 к наполнению. Все капсулы проходят визуальный контроль оператором.

ТП. 3. Получение капсулируемой массы**ТП. 3.1. Отвешивание компонентов**

На весоизмерительном приборе производят отвешивание компонентов (марала пантов измельченных, крахмала растворимого), которые отвечают требованиям НД.

ТП. 3.2. Смешивание компонентов

Рассчитанное количество компонентов смешивают в смесителе в течение 5 - 7 минут, соблюдая правила смешивания порошков.

ТП. 4. Наполнение и отбраковка капсул**ТП. 4.1. Наполнение капсул**

Наполнение капсул проводят в капсуляторе ДПР - 1. В процессе капсулирования, для контроля дозировки каждые 10 – 15 минут дозировщик взвешивает капсулы на электронных весах.

ТП. 4.2. Отбраковка капсул

Отсеивание пылевидной фракции с использованием плоского сита (качающиеся или вибрационные) с отверстиями 0,1 мм. и отбраковка пустых капсул в специальную емкость.

Готовые капсулы, соответствующие НД, передают на участок упаковки, маркировки.

УМО. 5. Фасовка, упаковка, маркировка**УМО. 5.1. Подготовка упаковки**

Для упаковки капсул используют банки полимерные с плотно закрываемыми крышками с винтовой горловиной.

УМО. 5.2. Фасовка капсул

Фасовка капсул осуществляется в банки полимерные с винтовой горловиной
Капсулы «Пантокап 0,20» фасуют по 30 штук в банки полимерные. Свободное пространство в банках заполняют ватой медицинской гигроскопической.

УМР. 5.3. Упаковка и маркировка

Размещение банок в групповую тару, маркировка. На этикетке указывают наименование предприятия-производителя и его товарный знак, название лекарственного средства, дозировку, количество капсул в упаковке, состав, условия хранения, номер серии, срок годности, регистрационный номер.

Контрольные точки технологического процесса представлены в табл.5.5.

Таблица 5.5.

Контрольные точки технологического процесса

Этап производства	Контрольные параметры	Значение
ВР.2. Подготовка компонентов для капсулирования	Измельченность сырья	Не более 0,3 мм, пылевидной фракции не более 2%
	Контроль номера капсул	Капсулы №1
ТП 3. Получение капсулируемой массы	Масса компонентов (марала панты измельченные, крахмал растворимый)	
	Скорость вращения мешалки	До 50 об/мин
	Однородность смешивания	Равномерная, однородная масса красно-коричневого цвета с белыми вкраплениями
ТП 4. Капсулирование	Средняя масса капсулы	0,415 – 0,426 г
УМО 5. Фасовка и упаковка капсул	Внешний вид упаковки	Банки полимерные герметично укупорены крышкой с винтовой горловиной
		Банки упакованы плотно, картонная коробка целостная, без повреждений

5.5. Стандартизация качества капсул «Пантокап»

По указанной технологии из 5 серии МПИ было получено 5 серии капсул (по 100 капсул в серии) и проведена оценка их качества по показателям, регламентируемым ГФ XIII изд., Том 2, ОФС.1.4.1.005.15 «Капсулы»: описание, средняя масса (отклонение массы каждой капсулы, отклонение массы содержимого каждой капсулы), подлинность, количественное определение, распадаемость, растворение, микробиологическая чистота.

Показатель «*описание*» оценивали органолептически. Все серии экспериментального препарата представляли собой твердые капсулы №1 цилиндрической формы с полусферическими концами, состоящие из корпуса и крышечки синего цвета, с гладкой поверхностью, без запаха. Содержимое капсул – порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной формы, с характерным запахом.

Среднюю массу капсул и однородность массы капсул «Пантокап» определяли по методике ГФ XIII изд., Том 2, ОФС.1.4.2.009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм». Данные исследований представлены в табл. 5.6.

Таблица 5.6

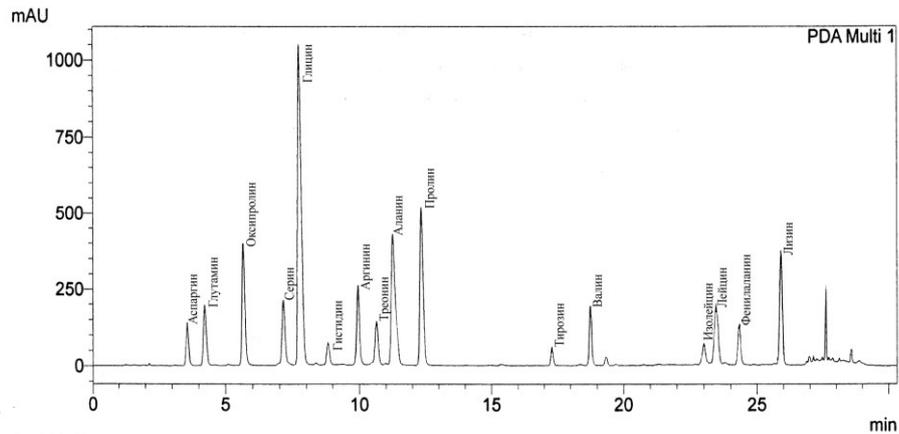
Средняя масса капсул, отклонение массы каждой капсулы и массы содержимого каждой капсулы

№ серии	Средняя масса, г	Отклонение от средней массы, %	Отклонение массы содержимого, %
1	0,426	0,23 - 2,35	0,03 – 2,66
2	0,427	0,02 – 2,14	0,02 – 2,84
3	0,427	0,03 – 3,45	0,03 - 3,80
4	0,415	0,34 – 2,11	0,54 – 2,26
5	0,424	0,94 – 5,19	0,11 – 6,59

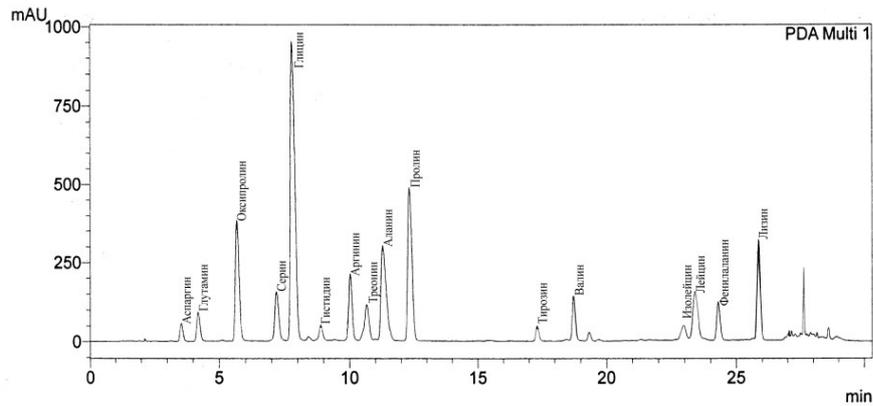
Как видно из данных таблицы 5.6, средняя масса капсул варьировала от 0,415 г до 0,427 г, при этом отклонение массы каждой капсулы и массы содержимого каждой капсулы от средней массы не превышало $\pm 7,5\%$, что соответствовало требованиям ГФ XIII изд., ОФС.1.4.1.005.15 «Капсулы». В дальнейшем содержимое 20 капсул каждой серии использовали для определения показателей «Подлинность» и «Количественное определение».

В основу определения показателя *подлинности* капсул «Пантокап» были положены методики, применяемые для оценки качества МПИ, определения

аминокислотного состава МПИ методом ВЭЖХ (раздел 2.5). Результаты представлены на рис. 5.3.



А



Б

Рис. 5.3. А – Хроматограмма СО; Б - Хроматограмма аминокислот капсул «Пантокап» после гидролиза и модификации ФИТЦ 2,9 %

Анализ хроматограмм позволил сделать заключение о том, что все исследуемые серии капсул «Пантокап» содержат набор аминокислот, характерный для измельченных марала пантов, при этом выявлено наличие 16 пиков производных аминокислот, в том числе глицина, аланина, пролина.

При оценке исследуемой методики выявлено, что стандартное отклонение между временем удерживания пиков СО глицина, аланина и пролина и соответствующих производных аминокислот в исследуемом образце не превышает 0,5% – нормы, указанной в технической документации прибора.

Сравнительная оценка времен удерживания пиков глицина, аланина и пролина СО и исследуемых растворов содержимого капсул 5 серий представлена в табл.5.7.

Сравнительная оценка времен удерживания пиков СО аминокислот и основных аминокислот в капсулах «Пантокап»

№ серии	Время удерживания пика СО, мин	Время удерживания пика исследуемого образца, мин	Отклонение, %
<i>Глицин</i>			
1	7,82	7,84	0,25
2	7,82	7,82	0
3	7,82	7,82	0
4	7,82	7,83	0,12
5	7,82	7,83	0,12
<i>Аланина</i>			
1	11,31	11,32	0,08
2	11,31	11,31	0
3	11,31	11,31	0
4	11,31	11,34	0,26
5	11,31	11,32	0,08
<i>Пролина</i>			
1	12,39	12,41	0,16
2	12,39	12,41	0,16
3	12,39	12,39	0
4	12,39	12,39	0
5	12,39	12,40	0,08

Установлено, что стандартное отклонение исследуемого показателя для всех исследуемых серий содержимого капсул не превышает 0,5%.

В основу *количественного определения* была положена методика качественного обнаружения (ВЭЖХ), т.к. обеспечивала хорошее разделение пиков (раздел 2.3).

Распадаемость капсул определяли согласно требованиям ГФ XIII изд., Том 2, ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул» на лабораторном идентификаторе процесса – приборе 545 Р-АК-1 «Качающаяся корзинка» (раздел 2.4.8).

Оценку качества по тесту «*Растворение*» проводили с использованием прибора АК 7 М-00-00 ПС типа «Вращающаяся корзинка» согласно требованиям ГФ XIII изд., Том 2, ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» (раздел 2.4.9). Учитывая характер определяемых БАВ (аминокислот), в качестве среды для растворения был выбран хлористоводородной кислоты раствор 0,1 н, соответствующий среде желудка. Количественное содержание определяли по сумме основных аминокислот с использованием предложенной нами методики (раздел 2.4.9).

Обобщенные результаты стандартизации капсул «Пантокап» представлены в табл. 5.8.

Данные, приведенные в табл. 5.8, свидетельствуют о том, что капсулы «Пантокап» соответствуют всем требованиям, предъявляемым ГФ XIII изд. к данной лекарственной форме. Содержание аминокислот варьирует: глицина от $0,0014 \pm 0,0002$ г, аланина от $0,00061 \pm 0,0004$ г, пролина от $0,00103 \pm 0,0003$ г. Высокие показатели тестов «Распадаемость» (до 9,5 мин) исследуемого экспериментального препарата подтверждают рациональность выбора капсул в качестве лекарственной формы для МПИ.

Микробиологическую чистоту капсул «Пантокап» определяли по методикам ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» на базе Барнаульского филиала ФГУ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту» (раздел 2.4).

В результате исследований было установлено, что общее число аэробных бактерий составляет $2,3 \times 10^2$ Кое/г, общее число грибов – 1×10^1 Кое/г, содержание энтеробактерий – менее 10^1 Кое/г. Кроме того, в препарате не обнаружены бактерии семейства *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* и *Staphylococcus aureus* (в 1 г препарата). Полученные результаты позволили сделать заключение о соответствии изучаемых капсул требованиям ГФ XIII изд., Том 1, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота», предъявляемым к лекарственным средствам категории ЗБ (приложение 4).

Данные вышеприведённых исследований по оценке качества капсул на основе МПИ были положены в основу разработки лабораторного регламента капсул «Пантокап» (приложение 10) и проекта НД «Пантокап капсулы 0,2» (приложение 6).

Определение радионуклидов цезия – 137 и стронция – 90 проводили в ФГБУ «Центральная научно-производственная ветеринарная радиологическая лаборатория» с помощью методики измерения активности радионуклидов с использованием сцинтилляционного гамма-спектрометра с программным обеспечением «Прогресс». Результаты испытаний выявили, что содержание цезия – 137 не превышает норму (не более 600,0 Бк/кг) и составляет 18,8 Бк/кг, стронция – 90 в пробе не обнаружено (раздел 2.8.14) (приложение 11).

Основные показатели качества капсул «Пантокап»

№ сери и	Описание	Подлинность ВЭЖХ (глицин, аланин, пролин)	Количественное содержание, г			Распада- емость, мин	Растворе- ние, %
			глицин	аланин	пролин		
1	Твердые капсулы № 1 цилиндрической формы с полусферическими концами, состоящие из корпуса и крышечки синего цвета, с гладкой поверхностью, без запаха. Содержимое капсул – порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной формы, характерным запахом.	На хроматограмме раствора содержимого капсул после расщеплении пептидных связей белка в ходе кислотного гидролиза с последующей модификацией аминокислот раствором ФИТЦ, наблюдаются пики со временем удерживания $\tau = 7,83$ мин, $11,32$ мин и $12,40$ мин, которые соответствуют пикам СО глицина, аланина, пролина ($SD < 0,5\%$)	0,0015±0,0004	0,00103±0,0003	0,00061±0,0002	9,50	83,32±1,84
2	То же	То же	0,0014±0,0002	0,00104±0,0005	0,00063±0,0006	9,45	82,21±2,25
3	То же	То же	0,0018±0,0002	0,00114±0,0004	0,00067±0,0005	9,55	83,56±2,15
4	То же	То же	0,0019±0,0003	0,00110±0,0002	0,00065±0,0004	9,48	81,57±2,05
5	То же	То же	0,0016±0,0005	0,00106±0,0003	0,00061±0,0005	9,48	83,18±1,52

5.6. Долгосрочные испытания стабильности капсул «Пантокап»

Прогнозирование сроков годности. С целью установления срока годности 5 серий капсул «Пантокап» были заложены на естественное хранение в защищённое от света место (относительная влажность не более 60%), при температуре 15-25 °С. Анализ препарата проводили каждые 6 месяцев по показателям, предлагаемым для стандартизации препарата (приложение 4). Проведенные эксперименты показали, что показатели качества исследуемых серий капсул «Пантокап» или не изменялись, или находились в пределах ошибки опыта в течение 1,5 лет. В результате исследований был установлен предварительный срок годности капсул «Пантокап» равный 1 году. Исследования стабильности препарата продолжаются.

Выводы по главе

1. Общетонизирующая активность марала пантов измельченных, установленная с помощью «Методики оценки выносливости мелких лабораторных животных» проявлялась в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг до 200 мг/кг. Результаты общетонизирующей активности марала пантов измельченных в различных дозах были сопоставимы, но при этом максимальное увеличение общетонизирующей активности отмечалось в дозе 100 мг/кг.

3. Марала панты измельченные, полученные по разработанной технологии, обладают неудовлетворительной сыпучестью ($4,46 \pm 0,12$ г/сек, угол естественного откоса $47,05 \pm 0,15^\circ$); большим насыпным объемом ($0,769 \pm 0,015$ г/мл); относительно не высоким показателем потери массы при высушивании ($6,76 \pm 0,06\%$) и высокой гигроскопичностью ($12,36 \pm 0,01\%$).

4. Улучшению технологических свойств марала пантов измельченных способствует добавление крахмала растворимого. При изготовлении капсул по прописи – *марала панты измельченные 0,20; крахмала растворимого 0,15*, уменьшаются гигроскопичность марала пантов измельченных (с $12,36 \pm 0,01\%$ до $7,30 \pm 0,01\%$), одновременно обеспечивается удовлетворительная сыпучесть ($6,63 \pm 0,06$ г/сек), угол естественного откоса ($38,30 \pm 0,10^\circ$). Для капсулирования марала пантов измельченных по данной прописи необходимо использовать капсулы 1 номера.

5. Капсулы «Пантокап», полученные по разработанной технологии, соответствуют требованиям ГФ XIII изд. и проекта НД «Пантокап капсулы 0,20» по следующим показателям: описание, подлинность, количественное содержание (глицина от 0,0014 г до 0,0019 г; аланина от 0,00103 г до 0,00114 г; пролина от 0,00061 г до 0,00067 г); средняя масса капсулы (от 0,415 г до 0,427 г), тест «Распадаемость» (от 9,45 до 9,5 мин), «Растворение» (от $81,57 \pm 2,05\%$ до $83,56 \pm 2,15\%$), микробиологическая чистота (категория 3Б).

6. Показатели качества капсул «Пантокап» или не изменялись, или находились в пределах ошибки опыта в условиях естественного хранения при относительной влажности воздуха не более 60% и температуре 15-25 °С в течение 1,5 лет. Рекомендуемый предварительный срок годности капсул «Пантокап» равен 1 году.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Марала панты измельченные, полученные по традиционной технологии, имеют фракционный состав с преобладанием частиц размером от 0,3 до 0,4 мм, содержат 16 производных аминокислот с преобладанием глицина, аланина и пролина, содержание которых варьирует в пределах от $5,82 \pm 0,08\%$ до $6,95 \pm 0,15\%$, от $2,19 \pm 0,09\%$ до $2,71 \pm 0,07\%$ и от $4,12 \pm 0,05\%$ до $4,67 \pm 0,09\%$ соответственно, при этом не соответствуют требованиям ГФ XIII изд. по показателю «Микробиологическая чистота»: общее число аэробных бактерий и энтеробактерий превышает требуемые показатели.

2. Методика определения массовой доли аминокислот методом ВЭЖХ может быть использована для качественного и количественного анализа основных аминокислот в марала пантах измельченных, так как экспериментальным путем доказаны пригодность хроматографической системы, специфичность (отклонение – 0,014% (глицин), 0,021% (аланин), 0% (пролин)); линейность ($R_2 = 0,9998$ (глицин), $R_2 = 0,9993$ (аланин), $R_2 = 0,9999$ (пролин)); диапазон применения (от 25 до 150%); правильность ($z = 99,69 \pm 0,90\%$ глицин, $z = 98,92 \pm 1,46\%$ аланин, $z = 97,74 \pm 0,76\%$ пролин) и прецизионность в условиях повторяемости ($RSD = 0,54\%$ (глицин), $RSD = 0,51\%$ (аланин), $RSD = 0,46\%$ (пролин)).

3. Установлено, что в марала пантах измельченных содержится не менее 16 аминокислот, такие как: глицин, аланин, пролин, аспарагин, глютамин, оксипролин, серин, гистидин, аргинин, треонин, тирозин, валин, изолейцин, лейцин, фенилаланин и лизин. Среди которых превалируют три аминокислоты: глицин ($\tau = 7,81$), аланин ($\tau = 11,34$), пролин ($\tau = 12,42$), содержание которых в исследуемых сериях пантах марала измельченных варьирует в следующих пределах от $5,84 \pm 0,03\%$ до $7,10 \pm 0,08\%$; от $2,15 \pm 0,06\%$ до $2,76 \pm 0,05\%$; от $4,11 \pm 0,07\%$ до $4,76 \pm 0,08\%$ соответственно.

4. Выявлено, что дополнительная термическая обработка (60°C , 240 мин), а также обработка УФ - излучением (при длине волны 254 нм, 180 мин и 360 мин) и СВЧ - излучением (700 Вт, 0,7 мин) не обеспечивают требуемую микробиологическую чистоту марала пантов измельченных. Сырье, обработанное ионизирующим излучением и спиртом этиловым 70% и 90%, соответствует требованиям ГФ XIII изд., ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» (категория 3Б). Экономически целесообразным и более выгодным является применение ионизирующего излучения.

5. Оптимальным способом дополнительной обработки марала пантов измельченных является ионизирующее излучение (10 кГр, 0,3 мин), так как экспериментальным путем доказано, что оно не влияет на качественный и количественный состав аминокислот, характерный для исходного сырья и сохраняет общетонизирующую активность в дозе 200 мг/кг.

6. На основании экспериментальных данных разработана рациональная технология получения марала пантов измельченных с включением дополнительной обработки ионизирующим излучением. Марала панты измельченные, полученные по разработанной технологии, соответствуют требованиям проекта НД «Марала панты измельченные» по показателям описание, подлинность, содержание аминокислот (глицин не менее 5%, аланин не менее 2%, пролин не менее 4%), размер частиц порошка (не более 0,3 мм, пылевидной фракции не более 2%), потеря в массе при высушивании (не более 7%), зола общая (не более 36%), микробиологическая чистота (категория 3Б).

7. В результате исследований по изучению влияния факторов окружающей среды на стабильность физико-химических показателей марала пантов измельченных в стресс-условиях установлено, что воздействие естественного дневного и искусственного света, а также повышенной влажности воздуха (100%) и температуры (70° С) приводит к снижению количественного содержания аминокислот (от 17 % до 45%), что следует учитывать при организации производства и хранения марала пантов измельченных. Предварительные сроки годности в условиях естественного хранения составили – 1 год.

8. В ходе фармакологических исследований установлено, что марала панты измельченные относятся к IV классу опасности (малоопасные вещества) согласно ГОСТу 12.1.007-76. Общетонизирующая активность марала пантов измельченных, установленная с помощью «Методики оценки выносливости мелких лабораторных животных», проявлялась в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг до 200 мг/кг, при этом максимальное увеличение общетонизирующей активности отмечалось в дозе 100 мг/кг.

9. В результате комплекса проведенных технологических и биофармацевтических исследований выбран оптимальный состав, разработана технология получения капсул «Пантокап», соответствующих требованиям ГФ XIII изд. и проекта НД «Пантокап капсулы 0,20» по следующим показателям: описание, подлинность, количественное содержание (глицина – не менее 0,0014 г; аланина – не менее 0,00103 г; пролина – не менее 0,00061 г), средняя масса капсулы (от 0,415г до 0,427г), тест «Распадаемость» (не

более 30 мин), тест «Растворение» (не менее 75+5%), микробиологическая чистота (категория 3Б). Предварительные сроки годности в условиях естественного хранения для капсул «Пантокап» – 1 год.

Список литературы

1. Актопротекторные препараты на основе пантов и растительных биофлавоноидов / В. Г. Шелепов [и др.] // Актуальные задачи развития отечественного рынка продуктов, услуг и технологий на основе сырья пантового оленеводства в интересах укрепления здоровья нации : материалы междунар. науч.-практ. конф., 12-13 сент. 2013 г. (пос. Катунь Алт. р-на Алт. края). – Бийск ; Барнаул, 2013. – С. 54–56.
2. Александров, В. В. Лечебно-профилактическое использование продуктов пантового оленеводства / В. В. Александров, С. И. Кудрявский. – Барнаул : Аз Бука, 2003. – 126 с.
3. Алексеев, К.В. Вспомогательные вещества в технологии твердых капсул / К.В. Алексеев, Е.В. Блынская, А.С. Сульдин, С.А. Сизяков, С.К. Алексеева, А.Г. Дитковская // Фармация. – №5. – 2009. – С. 31-36.
4. Березов, Т. Т. Биологическая химия : [учебник] / Т. Т. Березов, Б. В. Коровкин. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва : Медицина, 1998. – 704 с.
5. Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность : метод. рекомендации / М-во здравоохранения РФ, Федер. медико-биол. агентство. – Москва, 2017. – 134 с.
6. Брехман, И. И. Новые данные по фармакологии пантов пятнистого оленя : лекарственные средства Дальнего Востока / И. И. Брехман Ю. И. Добряков, А. Н. Танеева ; АН СССР, Сиб. отд-ние, Дальневост. фил. им. В. Л. Комарова, Ин-т биологически активных веществ. – Владивосток, 1968. – Вып. 9. – 114 с.
7. Брехман, И. И. Метод биологической оценки препаратов из пантов пятнистого оленя по стимулирующему действию / И. И. Брехман, М. А. Гриневиц // Материалы третьей конференции ЦНИЛ / Том. мед. ин-т, Центр. науч.-исслед. лаб. ; ред. Е. Д. Гольдберг. – Томск, 1966. – Т. 3. – С. 94–96.
8. Владимирова, Н. Ю. Технология производства, переработки и хранения продукции пантового оленеводства : учеб.-метод. пособие / Н. Ю. Владимирова, В. Г. Луницын, Н. И. Владимиров ; Алт. гос. аграр. ун-т. – Барнаул : Изд-во АГАУ, 2015. – 118 с.
9. Влияние концентрата «Пантованна» на физическую работоспособность спортсменов / Н. Г. Абдулкина [и др.] // Актуальные задачи развития отечественного рынка продуктов, услуг и технологий на основе сырья пантового оленеводства в интересах

- укрепления здоровья нации : материалы междунар. науч.-практ. конф., 12-13 сент. 2013 г. (пос. Катунь Алт. р-на Алт. края). – Бийск ; Барнаул, 2013. – С. 63–64.
10. Влияние лиофилизированных марала пантов на гуморальные показатели гомеостаза у спортсменов циклических видов спорта / Л. В. Барабаш [и др.] // Медицина труда и промышленная экология. – 2013. – № 9. – С. 27–31.
 11. Влияние экстракта марала пантов на показатели антиоксидантного статуса больных нейроциркуляторной дистонией / Л. В. Барабаш [и др.] // Актуальные задачи развития отечественного рынка продуктов, услуг и технологий на основе сырья пантового оленеводства в интересах укрепления здоровья нации : материалы междунар. науч.-практ. конф., 12-13 сент. 2013 г. (пос. Катунь Алт. р-на Алт. края). – Бийск ; Барнаул, 2013. – С. 57–59.
 12. Влияние возраста на пантовую продуктивность алтайских маралов интродуцированных в Заилийский Алатау / Д. Н. Есмуханбетов [и др.] // Современные научные тенденции в животноводстве, охотоведении и экологии : сб. ст. Междунар. науч.-практ. конф. – Киров, 2017. – С. 150–155.
 13. Влияние пантовых препаратов на выносливость белых крыс к физической нагрузке / Л. Н. Шорина [и др.] // Современные наукоемкие технологии. – 2007. – № 6 – С. 13–15.
 14. Влияние пантовых препаратов и продуктов пчеловодства на состояние кардиореспираторной системы у спортсменов [Электронный ресурс] / И. Н. Смирнова [и др.] // Медицина и образование в Сибири : сетевое науч. изд. – 2014. – № 3. – Режим доступа: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1394 (дата обращения: 10.08.2018).
 15. Галкин, А. В. Динамика липидного состава марала пантов в процессе их роста / А. В. Галкин // Новое в технологии пантового оленеводства : [сб. ст.] / М-во сел. хоз-ва РСФСР, Зверопром РСФСР, Центр. науч.-исслед. лаб. пантового оленеводства ; [под ред. В. С. Галкина]. – Барнаул, 1979. – С. 42–45.
 16. Галкин, В. С. Биологические ритмы у пантовых оленей и необходимость учета их практической деятельности / В. С. Галкин // Пантовое оленеводство : сб. науч. работ / Алт. науч.-исслед. и проектно-технол. ин-т животноводства, Центр. науч.-исслед. лаб. пантового оленеводства ; [сост. В. С. Галкин ; редкол.: С. М. Павленко и др.]. – Барнаул, 1975. – Вып. 4. – С. 23–28.

17. Галкин, В. С. Паровой способ варки пантов / В. С. Галкин // Новое в технологии пантового оленеводства : [сб. ст.] / М-во сел. хоз-ва РСФСР, Зверопром РСФСР, Центр. науч.-исслед. лаб. пантового оленеводства ; [под ред. В. С. Галкина]. – Барнаул, 1979. – С. 45–47.
18. Георгиевский, С. И. Влияние пантокринина на заживление ран / С. И. Георгиевский. – Барнаул, 1939. – [18] с. – (Рукопись).
19. Гептнер, В. Г. Олени СССР : (систематика, зоогеография) / В. Г. Гептнер, В. И. Цалкин. – Москва : Тип. Упр. делами Совета Министров СССР, 1947. – 176 с.: ил., карт.
20. Гнедов, А. А. К вопросу о консервации пантов северных оленей / А. А. Гнедов, Г. И. Тюпкин // Таймыр : документы Учред. съезда оленеводов и материалы науч.-практ. конф. «Современное состояние и развитие домашнего оленеводства и промысла дикого северного оленя» / [под общ. ред. Н. В. Ловелиуса]. – Дудинка ; Санкт-Петербург, 2004. – С. 23–26.
21. Горин, А. Д. СВЧ-вакуумная сушка пантов северного оленя / А. Д. Горин // Сельскохозяйственная наука АПК Сибири, Монголии, Казахстана и Кыргызстана : труды 7-й Междунар. науч.-практ. конф. (Улан-Батор, 19-23 июля 2004 г.) / [сост.: А. С. Донченко, И. Т. Литвиненко, В. Г. Шелепов]. – Новосибирск, 2004. – С. 183–187.
22. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – Введ. 1977-01-01. – Москва : Стандартиформ, 2007. – 7 с.
23. ГОСТ 4227-76. Марала панты и изюбра консервированные. Технические условия. – Взамен ГОСТ 4227-48 ; введ. 1977-06-01. – Москва : Изд-во стандартов, 1976. – 11 с.
24. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] : [сайт]. – Режим доступа : <http://grls.rosminzdrav.ru/> (дата обращения: 15.09.2018).
25. Государственная фармакопея Республики Беларусь : разработана на основе Европейской фармакопеи : в 3 т. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Респ. унитар. предприятие «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении». – Минск : МППТК полиграфии, 2006. – Т. 1 : Общие методы контроля качества лекарственных средств / [под общ. ред. Г. В. Годовальникова]. – 656 с. : ил., табл.
26. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс] / М-во здравоохранения РФ. – 13-е изд. – Москва, 2015. – Т. 1. – Режим доступа :

- http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/ (дата обращения: 15.09.2018).
27. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс] / М-во здравоохранения РФ. – 13-е изд. – Москва, 2015. – Т. 2. – Режим доступа : http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/ (дата обращения: 15.09.2018).
 28. Грандберг, И.И. Органическая химия: [учебник] / И.И. Грандберг, Н.Л. Нам. – 8-е изд. – Москва : Юрайт, 2016. – 608 с.
 29. Грибов, С. А. Препараты из продуктов пантового мараловодства в терапии больных железодефицитными анемиями / С. А. Грибов, М. В. Афонина // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии : тезисы докл. научн. конф. НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН. – Томск, 2002. – Т. 2. – С. 27–32.
 30. Добряков, Ю. И. Панты / Ю. И. Добряков. – Владивосток : Дальневост. кн. изд-во, 1970. – 32 с.
 31. Друри, И. В. Оленеводство / И. В. Друри, П. В. Митюшев. – Москва ; Ленинград : Сельхозиздат, [Ленингр. отд-ние], 1963. – 243 с.: ил.
 32. Егерь, В. Н. Пантовое оленеводство / В. Н. Егерь, Н. Г. Деев. – Москва : Колос, 1994. – 128 с.
 33. Зайцев, А. А. Продукты пантового оленеводства в спортивной медицине: опыт применения и перспективы использования / А. А. Зайцев // Продукция на основе сырья пантового оленеводства. Актуальные проблемы и перспективы ее использования в медицине и спорте высших достижений : материалы I Междисциплинарного конгресса, 10 сентября 2015 г. (г. Барнаул) / [науч. ред.: Б. И. Козлов, Н. А. Фролов]. – Бийск ; Барнаул, 2015. – С. 42–45.
 34. Зайденшнур, Э. В. Действие пантокрина на азотистый и углеводный обмен / Э. В. Зайденшнур // Труды Ин-та НИЛПО. – Москва ; Ленинград, 1936. – Сб. 2. – С. 10–22.
 35. Закономерности развития маралов в постнатальном онтогенезе / В. М. Жуков [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2010. – № 10. – С. 65–71.
 36. Иванкина, Н. Ф. Исследование химического состава, биологической активности пантов пятнистого и северного оленя, вторичного сырья пантового оленеводства в

- технологии получения кормовых добавок / Н. Ф. Иванкина ; Дальневост. гос. аграр. ун-т. – Благовещенск : Изд-во ДальГАУ, 2003. – 110 с.
37. Иванкина, Н. Ф. Липиды пантов пятнистого оленя : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 02.00.10 / Иванкина Наталья Федоровна ; Президиум Дальневост. отд-ния АН СССР. – Владивосток, 1990. – 24 с.
38. Иванкина, Н. Ф. Характеристика простагландинового экстракта пантов северных оленей / Н. Ф. Иванкина, С. В. Исай, Н. Р. Бусарова. – Владивосток, 1989. – С. 7. – (Сборник научных трудов / Тихоокеанский ин-т биоорг. химии Дальневост. отд-ния АН СССР ; № 34).
39. Информация по срезке пантов на 12.07.2018 г. [Электронный ресурс] // Министерство сельского хозяйства Республики Алтай : офиц. интернет-портал. – Режим доступа : <http://mcx-altai.ru/novosti/1183-informatsiya-po-srezke-pantov-na-12-07-2018-g/> (дата обращения:15.09.2018).
40. Исследование содержания липидов в продукции из марала пантов / Е. С. Баташов [и др.] // Актуальные задачи развития отечественного рынка продуктов, услуг и технологий на основе сырья пантового оленеводства в интересах укрепления здоровья нации : материалы междунар. науч.-практ. конф., 12-13 сент. 2013 г. (пос. Катунь Алт. р-на Алт. края). – Бийск ; Барнаул, 2013. – С. 35–39.
41. Кайзер, А. А. Технология заготовки и переработки биологического сырья северных оленей : дис ... д-ра с.-х. наук : 06.02.04 / Кайзер Андрей Александрович ; [Место защиты: Сиб. науч.-исслед. и проект.-технол. ин-т животноводства]. – Норильск, 2007. – 341 с.: ил.
42. Кейно, В. В. Новые подходы к стандартизации различных видов сырья животного происхождения / В. В. Кейно, К. В. Горячева, И. В. Смирнов // Биотехнология и общество в XXI веке : сб. ст. / М-во образования и науки РФ, Алт. гос. ун-т ; [редкол.: А. А. Ильичев (гл. ред.) и др.]. – Барнаул, 2015. – С. 32–36.
43. Киданов, Н. М. О гипотензивном эффекте пантокрина / Н. М. Киданов, В. Е. Размахин, Н. В. Осташева // Пантовое оленеводство : сб. науч. работ / Алт. науч.-исслед. и проектно-технол. ин-т животноводства, Центр. науч.-исслед. лаб. пантового оленеводства ; [сост. В. С. Галкин ; редкол.: С. М. Павленко и др.]. – Барнаул, 1975. – Вып.4. – С. 131–136.

44. Козлов, Б. И. Лечебно-оздоровительное использование продуктов пантового оленеводства : науч.-практ. пособие для врачей и фармацевтов / Б. И. Козлов ; М-во образования и науки РФ, Алт. гос. ун-т. – [2-е изд., испр. и перераб.]. – Барнаул : Изд-во АлтГУ, 2012. – 67 с.
45. Комплексное развитие мараловодческого хозяйства «Никольское» Алтайского района / П. А. Свиридов [и др.] // Продукция на основе сырья пантового оленеводства. Актуальные проблемы и перспективы ее использования в медицине и спорте высших достижений : материалы I Междисциплинарного конгресса, 10 сентября 2015 г. (г. Барнаул) / [науч. ред.: Б. И. Козлов, Н. А. Фролов]. – Бийск ; Барнаул, 2015. – С. 64–65.
46. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье : методика выполнения измерений массовой доли аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии : М-02-902-142-07 / Внедренч. фирма «Аналит». – Санкт-Петербург, 2007. – 19 с.
47. Кошелев, Ю. А. Клиническая апробация и подтверждение эффективности продукции серии «Марал®» производства ЗАО «Алтайвитамины» / Ю. А. Кошелев, Н. И. Кулешова, Е. С. Баташов // Продукция на основе сырья пантового оленеводства. Актуальные проблемы и перспективы ее использования в медицине и спорте высших достижений : материалы I Междисциплинарного конгресса, 10 сентября 2015 г. (г. Барнаул) / [науч. ред.: Б. И. Козлов, Н. А. Фролов]. – Бийск ; Барнаул, 2015. – С. 54–60.
48. Кроневальд, О. В. Ветеринарно-санитарная товарная характеристика пантовой и побочной продукции маралов / О. В. Кроневальд, Н. Е. Борисенко // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2013. – № 7 (105). – С. 082–083.
49. Кулишова, Т. В. Эффективность общего и местного воздействия пантовых препаратов в лечении андрогенетической алопеции / Т. В. Кулишова, Н. А. Табашникова, Н. А. Фролов // Актуальные задачи развития отечественного рынка продуктов, услуг и технологий на основе сырья пантового оленеводства в интересах укрепления здоровья нации : материалы междунар. науч.-практ. конф., 12-13 сент. 2013 г. (пос. Катунь Алт. р-на Алт. края). – Бийск ; Барнаул, 2013. – С. 47–52.

50. Куркин, В. А. Исследование номенклатуры адаптогенных лекарственных препаратов, представленных на фармацевтическом рынке Российской Федерации / В. А. Куркин, И. К. Петрухина, А. С. Акушанская // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 8-4. – С. 898–902.
51. Лакин, Г. Ф. Биометрия : [учеб. пособие для биол. специальностей вузов] / Г. Ф. Лакин. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва : Высш. шк., 1990. – 352 с.
52. Лечебно-профилактические средства из органов северных животных : практ. рекомендации / Ин-т биол. проблем криолитозоны СО РАН, Якут. гос. с.-х. акад. ; [А. К. Ахременко и др.] ; отв. ред. В. Т. Седалищев. – Якутск : ЯФ Изд-ва СО РАН, 2003. – 121 с.: ил., табл.
53. Лукьянов, А. Н. Перспективы развития сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности Алтайского края / А. Н. Лукьянов // *Аграрная наука - сельскому хозяйству : XII Междунар. науч.-практ. конф. [7-8 февр. 2016 г.] : сб. ст. : [в 3 кн.]*. – Барнаул, 2017. – Кн. 1. – С. 3–8.
54. Лукьянов, А. Н. Состояние пантового оленеводства и перспективы переработки сырья пантового оленеводства для региона и Российской Федерации / А. Н. Лукьянов // *Продукция на основе сырья пантового оленеводства. Актуальные проблемы и перспективы ее использования в медицине и спорте высших достижений : материалы I Междисциплинарного конгресса, 10 сентября 2015 г. (г. Барнаул) / [науч. ред.: Б. И. Козлов, Н. А. Фролов]*. – Бийск ; Барнаул, 2015. – С. 7–10.
55. Лунин, П. А. Исследование по разработке оптимальной технологии и стандартизации пантокринина из марала пантов : дис. ... канд. фармацевт. наук : 15.00.01 / Лунин Петр Александрович. – Пятигорск, 1989. – 156 с.: ил.
56. Лунин, П. А. Изучение кожного покрова марала пантов как дополнительного источника для получения пантокринина / П. А. Лунин // *Материалы V Всероссийского съезда фармацевтов : тез. докл. / М-во здравоохранения РСФСР, Всерос. науч. о-во фармацевтов*. – Ярославль, 1987. – С. 239–240.
57. Луницын, В. Г. Второстепенная продукция пантового оленеводства в оздоровительной практике / В. Г. Луницын, Ю. В. Луницына // *Проблемы пантового оленеводства и пути их решения : сб. науч. тр. / Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. науч.-исслед. ин-т пантового оленеводства*. – Барнаул : Азбука, 2013. – Т. 7. – С. 51–57.

58. Луницын, В. Г. Анализ существующих методов консервирования марала пантов на Алтае и их совершенствование / В. Г. Луницын, А. А. Неприятель, М. В. Попова // Современные проблемы и достижения аграрной науки в животноводстве и растениеводстве : сб. ст. / [редкол.: Ю. Ф. Загороднев (пред.) и др.]. – Барнаул : Изд-во АГАУ, 2003. – Ч. 4. – С. 284–289.
59. Луницын, В. Г. Производство, переработка и биохимический состав продукции пантового оленеводства / В. Г. Луницын ; Рос. акад. с.-х. наук, Сиб. отд-ние, Всерос. науч.-исслед. ин-т пантового оленеводства. – Барнаул, 2008. – 293 с.
60. Луницын, В. Г. Продукция пантового оленеводства (способы консервирования, переработки, использование) : монография / В. Г. Луницын, Н. А. Фролов ; Рос. акад. с.-х. наук, Сиб. отд-ние, Всерос. науч.-исслед. ин-т пантового оленеводства. – Барнаул, 2006. – 270 с.
61. Луницын, В. Г. Пантовое оленеводство России : [монография] / В. Г. Луницын ; Рос. акад. с.-х. наук, Сиб. отд-ние, Всерос. науч.-исслед. ин-т пантового оленеводства. – Барнаул : Алтай, 2004. – 581 с.: ил.
62. Луницын, В. Г. Мировой рынок пантовой продукции / В. Г. Луницын // Проблемы пантового оленеводства и пути их решения : сб. науч. тр. / Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. науч.-исслед. ин-т пантового оленеводства. – Барнаул, 2005. – Т. 2. – С. 5–14.
63. Луницын, В. Г. Оценка качества марала пантов / В. Г. Луницын, М. Н. Шалина // Аграрная наука - сельскому хозяйству : междунар. науч.-практ. конф. : сб. ст. : [в 3 кн.] / Алт. гос. аграр. ун-т. – Барнаул, 2006. – Кн. 2. – С. 116–119.
64. Луницын, В. Г. Биохимический состав марала пантов / В. Г. Луницын, А. И. Володкина // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2007. – № 10. – С. 45–49.
65. Луницын, В. Г. Новые подходы к переработке и использованию продукции мараловодства / В. Г. Луницын, А. А. Неприятель, И. С. Белозерских // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2015. – № 5. – С. 66–68.
66. Луницын, В. Г. Новые комплексные препараты на основе крови марала и биосубстанций из пантов и второстепенной продукции оленеводства / В. Г. Луницын, А. А. Неприятель, И. С. Белозерских // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2016. – № 5 (139). – С. 121–126.

67. Луницын, В. Г. Способы переработки продукции пантового оленеводства в Китае / В. Г. Луницын // Проблемы пантового оленеводства и пути их решения : сб. науч. тр. / Рос. акад. с.-х. наук, Сиб. отд-ние, Всерос. науч.-исслед. ин-т пантового оленеводства. – Барнаул, 2008. – Т. 4. – С. 152–155.
68. Луцаев, А. Ю. Применение средств на основе пантового сырья в спортивной медицине / А. Ю. Луцаев, Б. И. Козлов // Актуальные задачи развития отечественного рынка продуктов, услуг и технологий на основе сырья пантового оленеводства в интересах укрепления здоровья нации : материалы междунар. науч.-практ. конф., 12-13 сент. 2013 г. (пос. Катунь Алт. р-на Алт. края). – Бийск ; Барнаул, 2013. – С. 52–54.
69. Мелик-Гусейнов, В. В. Исследование макро- и микроэлементного состава некоторых видов сырья и шрота растительного и животного происхождения - источников современных нутрицевтиков / В. В. Мелик-Гусейнов, В. Б. Ушаков // Материалы 55-й региональной конференции по фармации, фармакологии и подготовке кадров. – Пятигорск, 2000. – С. 209–210.
70. Методика оценки качества марала пантов : [науч.-метод. рекомендации] / подгот. В. Г. Луницын и др.]. – Барнаул, 2007. – 55, [1] с.
71. Методические особенности измерения влажности пантов маралов / А. Ф. Алейников [и др.] // Методы и технические средства исследований физических процессов в сельском хозяйстве : труды ГНУ СибФТИ Россельхозакадемии : 1971-2011 / Рос. акад. с.-х. наук, Гос. науч. учреждение Сиб. физ.-техн. ин-т аграр. проблем ; [редкол.: В. В. Альт (отв. ред.) и др.]. – Новосибирск, 2011. – С. 89–93.
72. Мещеряков, В. М. Итоги развития оленеводства Республики Алтай, проблемы и пути их решения / В. М. Мещеряков // Инновационные технологии производства продукции пантового оленеводства и использование ее в укреплении здоровья нации : материалы науч.-практ. конф. (с междунар. участием), 29-30 сент. 2011 г. (г. Бийск Алт. края) / [науч. ред.: Б. И. Козлов, Н. А. Фролов]. – Бийск ; Барнаул, 2011. – С. 10–16.
73. Министерство сельского хозяйства Алтайского края. Раздел «Животноводство» [Электронный ресурс] : офиц. сайт. – Режим доступа : <http://www.altagro22.ru/apk/zhivotnovodstvo>. (дата обращения: 15.09.2018).

74. Миролубов, И. И. Пантовое оленеводство / И. И. Миролубов // Природа. – 1963. – № 5. – С. 96–99.
75. Митюшев, П. В. Инструкция по консервированию марала пантов способом комбинирования варки и горячей сушки / П. В. Митюшев. – Барнаул, 1947. – [6] с. – (Рукопись).
76. Митюшев, П. В. Пантовое оленеводство и болезни пантовых оленей / П. В. Митюшев, М. П. Любимов, В. К. Новиков. – Москва : Междунар. книга, 1950. – 240 с.
77. Модина, Т. Д. Климат и агроклиматические ресурсы Алтая : монография / Т. Д. Модина, М. Г. Сухова. – Новосибирск : Универс. кн. изд-во, 2007. – 180 с.
78. Мукаева, Л. Н. Мараловодство Алтая: от зарождения до превращения в успешную отрасль России / Л. Н. Мукаева // VII Всемирный конгресс оленеводов : сб. материалов / М-во сел. хоз-ва РФ, Правительство Алтайского края. – Барнаул, 2018. – С. 62–65.
79. Мухортов, С. А. Биорегулирующие свойства пептидов Хавинсона в продукции пантового оленеводства компании «Алтайский букет» / С. А. Мухортов // Продукция на основе сырья пантового оленеводства. Актуальные проблемы и перспективы ее использования в медицине и спорте высших достижений : материалы I Междисциплинарного конгресса, 10 сентября 2015 г. (г. Барнаул) / [науч. ред.: Б. И. Козлов, Н. А. Фролов]. – Бийск ; Барнаул, 2015. – С. 60–63.
80. Нанзатов, Б. З. Рога оленей (панты) как основное лекарственное сырье торгово-обменных отношений между Россией, Монголией и Китаем в XVII-XIX веках / Б. З. Нанзатов, М. М. Содномпилова // Иркутский историко-экономический ежегодник, 2016 / М-во образования и науки РФ, Байкал. гос. ун-т ; [редкол.: В. М. Левченко и др.]. – Иркутск : Изд-во БГУ, 2016. – С. 166–174.
81. Неприятель, А. А. Усовершенствование методов срезки, консервирования пантов и переработки продукции пантового оленеводства : дис. ... канд. с.-х. наук : 06.02.04 / Неприятель Алексей Анатольевич. – Барнаул, 2004. – 125 с.
82. Об утверждении краевой целевой программы «Развитие комплексной переработки продуктов пантового оленеводства в Алтайском крае» на 2011 – 2015 годы [Электронный ресурс] : постановление Администрации Алтайского края от

- 19.11.2010 № 518 // Официальный сайт Алтайского края. – Режим доступа : <https://www.altairegion22.ru/upload/iblock/005/518.PDF> (дата обращения:15.09.2018).
83. Об утверждении долгосрочной целевой программы «Здоровое питание населения Алтайского края» на 2013 – 2017 годы [Электронный ресурс] : постановление Администрации Алтайского края от 11.06.2012 № 314 // Официальный сайт Алтайского края. – Режим доступа : https://www.altairegion22.ru/upload/iblock/4e8/314_12.PDF (дата обращения:15.09.2018).
84. Об утверждении государственной программы Алтайского края «Развитие сельского хозяйства Алтайского края» на 2013 – 2020 годы [Электронный ресурс] : постановление Администрации Алтайского края от 05.10.2012 № 523 – Режим доступа : <http://docs.cntd.ru/document/453122723> (дата обращения:15.09.2018).
85. Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики : приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н // Бюллетень нормативных актов федеральных органов исполнительной власти. – 2016. – № 37.
86. Оздоровительно-профилактические медицинские технологии применения продуктов пантового оленеводства : учеб. пособие / В. В. Александров [и др.]. – Барнаул : Изд-во Алт. ун-та, 2004. – 68 с.
87. О продуктивности парковых пастбищ маралов в условиях Центрального Алтая / С. Я Сыева [и др.] // VII Всемирный конгресс оленеводов : сб. материалов / М-во сел. хоз-ва РФ, Правительство Алтайского края. – Барнаул, 2018. – С. 88–92.
88. Осинцев, Н. С. Динамика минеральных веществ в пантах северных оленей горно-таежной зоны / Н. С. Осинцев // Биологические основы использования лекарственного сырья из продукции оленеводства / Всесоюз. акад. с.-х. наук им. Ленина, Сиб. отд-ние, Науч.-исслед. ин-т сел. хоз-ва Крайнего Севера ; отв. ред. А. И. Соломаха. – Новосибирск, 1990. – С. 23–29.
89. ОФС 1.4.1.0010.15. Порошки – 5с.
90. Павленко, С. М. О саногенетических свойствах пантокринина и принципах его дальнейшего изучения / С. М. Павленко // Пантовое оленеводство : сб. науч. работ / Алт. науч.-исслед. и проектно-технол. ин-т животноводства, Центр. науч.-исслед. лаб. пантового оленеводства ; [сост. В. С. Галкин ; редкол.: С. М. Павленко и др.]. – Барнаул, 1975. – Вып.4. – С. 89–92.

91. Павлова, А. В. Научное и практическое обоснование рационального использования продукции мараловодства в условиях Тувы : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.02.04 / Павлова Алла Витальевна. – Барнаул, 2000. – 19 с.
92. Пат. 028030/В1 Евразийское патентное ведомство. Способ количественного определения биологической активности экстракта пантов / Т.А. Харлампович, О.А. Шмакова; заявитель и патентообладатель Закрытое акционерное общество ЭВАЛАР (RU); – №028030/В1; заявл. 2015.12.14; опубл 2017. 27.09. – 5 с.
93. Попова, И. С. Перспективы развития переработки сырья пантового оленеводства в Алтайском крае / И. С. Попова, Е. Ф. Шарахова // Известия Алтайского государственного университета. Сер.: Биологические науки. Науки о Земле. Химия. – 2012. – № 3/1. – С. 60–65.
94. Простагландины пантов пятнистых оленей / С. В. Исай [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1994. – Т. 28, № 7. – С. 60–63.
95. Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов // В. Н. Каркищенко [и др.] // Биомедицина. – 2011. – № 1. – С. 72–74.
96. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2002. – 312 с.
97. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / М-во здравоохранения РФ, ФГБУ «Науч. центр экспертизы средств медицинского применения»; [редкол.: А. Н. Миронов (пред.) и др.]. – Москва : Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с.
98. Сатаев, Р. Р. Сравнительный анализ ряда пантовых препаратов: научное издание / Р. Р. Сатаев, А. Л. Верещагин, Н. В. Бычин // Новые технологии и комплексное использование природных ресурсов Алтайского края для производства биологически активных добавок : материалы науч.-практ. конф., 17-20 июня 2003 г. / [редкол.: В. А. Тутельян и др.]. – Бийск ; Барнаул, 2003. – С. 134–138.
99. Сборник научных работ научно-исследовательской лаборатории пантового оленеводства / Алт. науч.-исслед. ин-т сел. хоз-ва, Науч.-исслед. лаб. пантового оленеводства. – Горно-Алтайск : Алт. кн. изд-во, Горно-Алт. отд-ние, 1969. – Вып. 2, Ч. 2 : Пантокрин / под ред. С. М. Павленко. – 141 с.

100. Силаев, А. Б. Биологически активные вещества пантов и пантокрин / А. Б. Силаев // Прогрессивная технология пантового оленеводства / Центр. науч.-исслед. лаб. пантового оленеводства ; [под ред. В. С. Галкина]. – Москва, 1982. – С. 96–101.
101. Сметанина, М. Д. Оценка биологического действия пантовых препаратов на животных / М. Д. Сметанина, Л. Н. Шорина, В. В. Петров // Вопросы биологии, экологии, химии и методики обучения : сб. науч. тр. / [редкол.: Г. В. Бондаренко (отв. ред.) и др.]. – Саратов, 2009. – Вып. 11. – С. 45–48.
102. Сравнительная характеристика состава липидов марала пантов, пантокрин и жмыха, остающегося после получения пантокрин / О. М. Шампанова [и др.] // Пантовое оленеводство : сб. науч. работ науч.-исслед. лаб. пантового оленеводства / под ред. П. В. Митюшев. – Горно-Алтайск, 1971. – Вып. 3. – С. 111–116.
103. Стимуляции гемопоза и физической работоспособности у спортсменов на фоне приема препарата на основе плазмы крови маралов / И. Н. Смирнова [и др.] // Актуальные задачи развития отечественного рынка продуктов, услуг и технологий на основе сырья пантового оленеводства в интересах укрепления здоровья нации : материалы междунар. науч.-практ. конф., 12-13 сент. 2013 г. (пос. Катунь Алт. р-на Алт. края). – Бийск ; Барнаул, 2013. – С. 61–62.
104. Суцевский, В. И. Экспериментально-клиническое обоснование применения водного экстракта пант марала в практике восстановительной медицины : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.51 / Суцевский Вениамин Иванович ; Алт. гос. мед. ун-т. – Москва, 2004. – 24 с.
105. Тарасова, А. Ю. Роль инноваций в развитии отрасли пантового оленеводства Республики Алтай / А. П. Попов, А. Ю. Тарасова // Аграрно-экономическая наука о проблемах инновационного развития агропромышленного производства : материалы I Междунар. практ. конф., 28-29 июня 2007 г. / [редкол.: Н. Б. Гаврилова [и др.] – Омск, 2007. – Ч. 2. – С. 73–76.
106. Тимофеевский, А. Д. Фармакология рога марала / А. Д. Тимофеевский, Л. П. Масленников // Сибирский архив теоретической и клинической медицины. – 1929. – Т. 4, кн. 3-4. – С. 120–129 ; кн. 10-12. – С. 659–665.
107. Танеева, А. И. Некоторые данные о фармакологическом действии пантов пятнистого оленя : автореф. дис. ... канд. биол. наук (14.775) / А. И. Танеева ; Перм. гос. мед. ин-т. – Пермь, 1970. – 21 с.

108. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : [учебник] / Н. А. Тюкавкина, Ю. И. Бауков, С. Э. Зурабян. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 416 с.
109. Филиппович, Ю.Б. Биохимические основы жизнедеятельности человека: [учебник.] / Ю.Б. Филиппович, А.С. Конищев и др. – Москва: ВЛАДОС, 2005. – 407 с.
110. Фролов, Н. А. Повышение эффективности развития пантового оленеводства Республики Алтай : монография / Н. А. Фролов ; Всерос. науч.-исслед. ин-т пантового оленеводства. – Барнаул : Изд-во Алт. гос. ун-та, 2005. – 146 с.: ил., табл.
111. Химическая природа биологически активных веществ пантов / А. Б. Силаев [и др.] // Пантовое оленеводство : сб. науч. работ / Алт. науч.-исслед. и проектно-технол. ин-т животноводства, Центр. науч.-исслед. лаб. пантового оленеводства ; [сост. В. С. Галкин ; редкол.: С. М. Павленко и др.]. – Барнаул, 1975. – Вып. 4. – С. 93–100.
112. Цалкин, В. И. Материалы к изучению рогов у настоящих оленей / В. И. Цалкин // Зоологический журнал. – 1946. – Т. 24, № 4. – С. 30–34.
113. Чернова, И. В. Панты и кровь в народной медицине населения Саяно-Алтайского региона в конце XIX-XX вв. / И. В. Чернова // Известия Алтайского государственного университета. Сер.: История. Политология. – 2009. – № 4/3. – С. 250–252.
114. Шатц, В. Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография : Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии / В. Д. Шатц, О. В. Сахартова ; АН Латв. ССР, Ин-т орган. синтеза. – Рига : Зинатне, 1988. – 390 с.
115. Шелепов, В. Г. Северное оленеводство. Технология заготовки и переработки пантов, эндокринно-ферментного и специального сырья / В. Г. Шелепов. – Москва : ПОЛТЕКС, 1998. – 136 с.
116. Шик, Р. Г. Гистологическое исследование панта марала / Р. Г. Шик // Сборник научных работ научно-исследовательской лаборатории пантового оленеводства. – Горно-Алтайск, 1969. – Вып. 2, ч. 2 : Пантокрин. – С. 33–36.
117. Эпштейн, Н. А. О требованиях к пригодности хроматографической системы при контроле качества лекарственных субстанций и препаратов методом ВЭЖХ / Н. А. Эпштейн, С. В. Емшанова // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42, № 11. – С. 34–40.

118. Эпштейн, Н. А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе / Н. А. Эпштейн // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38, № 4. – С. 40–55.
119. Юдин, А. М. Панты и антелеры: рога как лекарственное сырье / А. М. Юдин. – Новосибирск : Наука : Сиб. изд. фирма, 1993. – 119 с.
120. Юдин, А. М. Панты северного оленя : (руководство по заготовке и консервированию неокостеневших рогов самцов в качестве лекарственного сырья) / А. М. Юдин, Ю. И. Добряков. – Владивосток, 1974. – 28 с.
121. Ярцев, В. Г. Аминокислотный и минеральный состав отходов производства пантокрина / В. Г. Ярцев // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 1988. – № 6. – С. 49–53.
122. 鹿产品质量标准吉林省地方标准 (规范) DB22 [Regional standard of reindeer product quality in Jilin province (specification)] /810–93/ <https://wenku.baidu.com/view/142258bdf121dd36a32d820c.html> [Article in Chinese].
123. Allen, S. P. A role for retinoic acid in regulating the regeneration of deer antlers / Steven P. Allen, Malcolm Maden, Joanna S. Price // *Developmental Biology*. – 2002. – Vol. 251, No. 2. – P.409-423.
124. Bi, D. Quantitative analysis of nucleosides and nucleobases in deer antler: variation in different species / D. Bi, L. M. L. Zhang, Wei-Lun Tang, et al. // *Pharmaceutica Analytica Acta*. – 2016. – Vol. 7, No. 474. – P. 1-6. DOI: 10.4172/2153-2435.1000474.
125. Chen, F. Preparation and determination of insulin-like growth factor I in deer antler, heart and blood / Fan-Bo Chen, Jian-Yuan Yin, Jing-Yan Liu, et al. // *Zhong Yao Cai (Journal of Chinese Medicinal Materials)*. – 2014. – December. – Vol. 37, No. 12. – P. 2155-2158. [Article in Chinese].
126. Faucheux, C. Cells in regenerating deer antler cartilage provide a microenvironment that supports osteoclast differentiation / Corinne Faucheux, Stephen A. Nesbitt, Michael A. Horton, et al. // *The Journal of Experimental Biology*. – 2001. –Vol. 204, No. 3. – P. 443-455.
127. Fengyan, S. Protein component extraction and its bioactivity determination of sika deer antler base // Su Fengyan, Li Huiping, Wang Yanmei, et al. // *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*. – 2001. – Vol. 2.

128. Ford, C. Deer velvet processing in New Zealand / C. Ford // [Proceedings of the 2nd International Symposium on Antler Science and Product Technology]. – New Zealand, 2004. – P. 141-147.
129. Francis, S. M. Detection of growth factors and proto-oncogene mRNA in the growing tip of red deer (*Cervus elaphus*) antler using reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) / Susan M. Francis, James M. Suttie // *Journal of Experimental Zoology. Part A: Ecological Genetics and Physiology*. – 1998. – Vol. 281, Issue 1. – P. 36-42.
130. Gao, L. HPLC–MS/MS shotgun proteomic research of deer antlers with multiparallel protein extraction methods / Liang Gao, Dingyin Tao, Yichu Shan, et al. // *The Journal of Chromatography B*. – 2010. – Vol. 878, No. 32. – P. 3370-3374.
131. Gu, L. Effects of red deer antlers on cutaneous wound healing in full-thickness rat models / LiJuan Gu, Eun-Kyoung Mo, Zhihong Yang, et al. // *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. – 2008. – Vol. 21, No. 2. – P. 277-290. – Режим доступа: <https://www.scopus.com/>. - DOI: 10.5713/ajas.2008.70348.
132. Gu, L. Partial purification and quantification of insulin-like growth factor-I from red deer antler / LiJuan Gu, Eun-Kyoung Mo, ZheMing Fang, et al. // *Journal of Life Science*. – 2007. – Vol. 17, No. 10. – P. 1321-1329.
133. Haigh, J. C. The reproductive impact of dietary antler fed to breeding mice / Jerry C. Haigh, S. R. Haines, I. Bogden // [Proceedings of the 1st International Symposium on Antler Science and Product Technology]. – Canada, Banff Centre, 2000.
134. Jeon, B. Effect of antler growth period on the chemical composition of velvet antler in sika deer (*Cervus nippon*) / Byongtae Jeon, Sungjin Kim, Sangmoo Lee, et al. // *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*. – 2009. – September. – Vol. 74, Issue 5. – P. 374-380.
135. Jeon, B. Effects of dietary protein level on dry matter intake, and production and chemical composition of velvet antler in spotted deer fed forest by-product silage/ B.T. Jeon, M.H. Kim, S.M. Lee et al. // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. – 2006. – Vol. 19, Issue 12. - P. 1737-1741
136. Jiang, N. Purification, identification and hypoglycemic activity in vitro of a novel peptide from red deer antler / N. Jiang, S. Zhang, J. Zhu. et. al.// *Journal of China Pharmaceutical*. – 2016. –Vol. 47, Issue 3. –P.363-367.

137. Jhon, G. Studies of the chemical structure of gangliosides in deer antler, Cervus nippon / Gil-Ja Jhon, Sun-Young Park, So-Yeop Han, et al.; Pharmaceutical Society of Japan // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 1999. – Vol. 47, No. 1. – P. 123-127.
138. Kawtikwar, P. S. Deer antlers – traditional use and future perspectives / Pravin S. Kawtikwar, Durgacharan Arun Bhagwat, Dinesh M. Sakarkar // Indian Journal of Traditional Knowledge. – 2010. – Vol. 9, Issue 2. – P. 245-251.
139. Kaylor, M. J. Velvet antler: ancient tonic, modern medicine / Mark J. Kaylor // Total Health. – 2000. – Vol. 22, No. 4. – P. 46-47.
140. Landete-Castillejos, T. Does chemical composition of antler bone reflect the physiological effort made to grow it / Landete-Castillejos, T., Estevez, J.A., Martínez, A. et al. // Bone – Vol. 40, Issue 4. - P. 1095-1102.
141. Lee, D. H. Isolation and characterisation of collagen from elk antler velvet / D. H. Lee, H. Hong, G. Lodhi, et al. // Animal Production Science. – 2014. – Vol. 54, Issue 8. – P. 1095-1101.
142. Li, H. The velvet chemical compositions of velvet - deer breeds or strains in China / H. Li // Journal NE Forestry Unic. – 2003. – Vol. 31. – P. 26–28.
143. Liu, M. Bioactive peptides derived from traditional Chinese medicine and traditional Chinese food: a review / Ming Liu, Yunpu Wang, Yuhuan Liu, et al. // Food Research International. – 2016. – Vol. 89, Part 1. – P. 63-73. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.08.009. Epub 2016 Aug 15.
144. Mainka, S. A. Wildlife and traditional Chinese medicine: supply and demand for wildlife species / Susan A. Mainka, Judy A. Mills // The Journal of Zoo and Wildlife Medicine. – 1995. – Vol. 26, No. 2. – P. 193-200.
145. Moreau, M. Clinical evaluation of a powder of quality elk velvet antler for the treatment of osteoarthritis in dogs / Maxim Moreau, Jacques Dupuis, Norbert H. Bonneau, et al. // The Canadian Veterinary Journal. – 2004. – February. – Vol. 45, No. 2. – P. 133-139.
146. Price, J. S. Deer antlers: a zoological curiosity or the key to understanding organ regeneration in mammals / Joanna S. Price, Steve P. Allen, Corinne Fauchoux, et al. // The Journal of Anatomy. – 2005. – Vol. 207, No. 5. – P. 603-618.
147. Price, J. S. Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers / Joanna S. Price, Steve P. Allen // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2004. – Vol. 359. – P. 809-822.

148. Sleivert, G. The effects of deer antler velvet extract or powder supplementation on aerobic power, erythropoiesis, and muscular strength and endurance characteristics / Gordon Sleivert, Val Burke, Craig Palmer, et al. // *The International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. – 2003. – Vol. 13, No. 3. – P. 251-265.
149. Still, J. Use of animal products in traditional Chinese medicine: environmental impact and health hazards / Jessica Still // *Complementary Therapies in Medicine*. – 2003. – Vol. 11, No. 2. – P.118-122.
150. Sui, Z. Bioactive components of velvet antlers and their pharmacological properties / Zhigang Sui, Lihua Zhang, Yushu Huo, et al. // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2014. – January. – Vol. 87. – P. 229-240.
151. Sunwoo, H. H. Chemical composition of antlers from wapiti (*Cervus elaphus*) / Hoon H. Sunwoo, Takuo Nakano, Robert J. Hudson, et al. // *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1995. – November. – Vol. 43, No. 11. – P. 2846-2849. – DOI: 10.1021/jf00059a014
152. Sunwoo, H. H. A close look potentials of antler chemicals and bioactives: chemical, pharmacological and molecular characteristics of active components for biomedical and nutraceutical uses / Hoon H. Sunwoo, Jeong S. Sim // [Proceedings of the 1st International Symposium on Antler Science and Product Technology]. – Banff: Banff Centre Canada, 2000. – P. 23-24.
153. Sunwoo, H. H. Effect of water-soluble extract from antler of wapiti (*Cervus elaphus*) on the growth of fibroblasts / Hoon H. Sunwoo, Takuo Nakano, Jeong S. Sim // *Canadian Journal of Animal Science*. – 1997. – Vol. 77, No. 2. – P. 343-345.
154. Tseng, S. Comparison of chemical compositions and osteoprotective effects of different sections of velvet antler / Sung-Hui Tseng, Chun-Hsien Sung, Lih-Geeng Chen, et al. // *The Journal of Ethnopharmacology*. – 2014. – Vol.151, No. 1. – P. 352-360.
155. Tseng, S. Effects of different forages on the chemical compositions and antiosteoporotic activities of velvet antlers / Sung-Hui Tseng, Lih-Geeng Chen, Ying-Jang Lai, et al. // *Animal Science Journal*. – 2016. – Vol. 87, No. 8. – P. 989-996.
156. Wang, H. Preparation and purification of velvet antlers peptides and its antioxidant activities // Hua Wang, Yi-Bing Huang, Xiang Gao Ke, et al. // *Chemical Journal of Chinese Universities*. – 2010. – Vol. 31, No. 12. – P. 2390-2395.

157. Wang, S. Study on the varying patterns of total phospholipids, selenium, phosphorus, reducing sugar and total sugar, hydrolyzed amino acids in the velvet antler of Northeast sika deer in growth period / Shu-Li Wang, Yan-Mei Wang // MATEC Web of Conferences. – EDP Sciences. – 2016. – Vol. 62. – P. 03003. – DOI:10.1051/ mateconf/2016620.
158. Wang, B. Stimulating effect of deer antler extract on protein synthesis in senescence-accelerated mice *in vivo*. / B. Wang, X. Zhao, S. Qi, et al. // Chemistry Pharm Bull (Tokyo). – 1988. – Vol. 36. – P. 2593-2598.
159. Wu, F. Deer antler base as a traditional Chinese medicine: a review of Its traditional uses, chemistry and pharmacology / Feifei Wu, Huaqiang Li, Liji Jin, et al. // The Journal of Ethnopharmacology. – 2013. – Vol. 145, No. 2. – P. 403-415. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23246455>
160. Xu, G. Rapid assessment of quality of deer antler slices by using an electronic nose coupled with chemometric analysis/ G. Xu, C. Liao, X. Ren et al. // Brazilian Journal of Pharmacognosy/ -2014/ - Vol. 24, Issue 6.- P. 716-721.
161. Yang, Z. Red deer antler extract accelerates hair growth by stimulating expression of insulin-like growth factor I in full-thickness wound healing rat model / Zhi Hong Yang, Li Juan Gu, Dong Liang Zhang, et al. // Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS). – 2012. – Vol. 25, No. 5. – P. 708-716.
162. Yan Z. Study on fingerprint of Corn Cervi Pantotrichum by HPCE / Z. Yan Z., R. Yuan. C. Wan., et al. // Food Science Technol. – 2009. – Vol. 34. – P. 254-258.
163. Zang, Z. Effects of velvet antler polypeptide on sexual behavior and testosterone synthesis in aging male mice / Zhi-Jun Zang, Hong-Feng Tang, Ying Tuo, et al. // The Asian Journal of Andrology. – 2016. – Vol. 18, No. 4. – P. 613-619.
164. Zha, E. Wound healing by a 3.2 kDa recombinant polypeptide from velvet antler of Cervus Nippon Temminck / Enhui Zha, Shenyang Gao, Yuzhen Pi, et al. // Biotechnology Letters. – 2012. – Vol. 34, No. 4. – P. 789-793. – DOI: 10.1007/s10529-011-0829-8. – Epub 2011 Dec 24.
165. Zhang, H. Toxicological evaluation of New Zealand deer velvet powder. Part I: Acute and subchronic oral toxicity studies in rats / Hu Zhang, Sompon Wanwimolruk, P. F. Coville, et al. // Food Chemistry and Toxicology. – 2000. – Vol. 38, No. 11. – P. 985-990.

166. Zhang, S. Determination of amino acids in Cornu Cervi Pantotrichum of different specifications / Song Zhang, Feng Li // *Zhongguo Zhongyao Za Zhi = China Journal of Chinese Materia Medica*. – 2013. – Vol. 38, No. 12. – P. 1919-1923.
167. Zhao, L. Immunomodulatory effects of aqueous extract of velvet antler (*Cervus elaphus* Linnaeus) and its simulated gastrointestinal digests on immune cells in vitro / Lei Zhao, Bao-Ping Ji, Bo Li, et al. // *Journal of Food and Drug Analysis*. – 2009. – Vol. 17, No. 4. – P. 282-292.
168. Zhou, S. Preliminary study of quantitative and character inheritance of Antlers / S. Zhou, S. Wu // *Acta Genetica Sinica*. – 1979. – No. 6. – P. 434-440.
169. Zhou, R. RP - HPLC simultaneous determination of three biological base in antler velvet // R. Zhou, S. Li // *Chin Journal Pharm Anal*. – 2009. – Vol. 29. –P. 575–578.
170. Zong, Y. Simultaneous quantification and splenocyte-proliferating activities of nucleosides and bases in Cervi Cornu Pantotrichum / Y. Zong, Y. Wang ,H. Li, et al. // *Pharmacognostic Mag*. – 2014. – Vol.10. – P. 391-397.
171. Zhou, Q. A comparison of chemical composition and bioactivity of polypeptides from velvet antlers of *Cervus nippon temminck* and *Cervus elaphus* Linnaeus / Q Zhou, Y. Liu, Y. Wang, et al. // *Zhongguo Zhongyao Zazhi*. – 2001. - Vol. 26, Issue 10. – PP. 702.

Приложения

(перечень)

№ п/п	Наименование приложения
1	Протокол лабораторных исследований на микробиологическую чистоту «Марала панты измельченные»
2	Протокол лабораторных исследований на микробиологическую чистоту капсул «Пантокап»
3	Таблица изучения срока годности «Марала панты измельченные»
4	Таблица изучения срока годности капсул «Пантокап»
5	Проект НД «Марала панты измельченные»
6	Проект НД капсул «Пантокап 0,20»
7	Акт проведения апробации технологии «Марала панты измельченные»
8	Акт проведения апробации технологии капсул «Пантокап 0,20»
9	Лабораторный регламент на производство «Марала панты измельченные»
10	Лабораторный регламент на производство капсул «Пантокап 0,20»
11	Протокол испытаний на радионуклиды марала пантов измельченных
12	Акт о внедрении в учебный процесс кафедры фармации ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России результатов исследований соискателя Земцовой Н.П.

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Барнаульский филиал
Федерального бюджетного учреждения здравоохранения
«Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту»

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР

Фактический адрес: 656031, г. Барнаул, ул. Привокзальная, 47
Телефон/факс: (3852) 29-20-84, 62-77-96
E-mail sesgd@mail.ru

Аттестат аккредитации
№ РОСС RU. 0001.512081 от 26.08.2013г
Действителен до 26.08.2018г

ПРОТОКОЛ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ № 1020
от « 22 » декабря 2015г

Наименование пробы (образца):	панты марала измельченные (серия № 1)
Код пробы:	1020.1.15.12.
Дата изготовления:	2015г
Дата и время отбора:	16.12.2015г. в 09.00
Дата и время доставки:	16.12.2015г. в 10.00
Наименование изготовителя, адрес:	не указано
Наименование организации (Заказчик), юридический адрес:	чл Земцова Н.П. г. Барнаул, ул. Баумана, 39
Наименование объекта, фактический адрес:	чл Земцова Н.П. г. Барнаул, ул. Баумана, 39
Место отбора:	не указано
Цель исследования (СанПиН, ГОСТ и др):	на соответствие: ГФ РФ издание Х11 выпуск 2007г. ОФС 42-0067-07 «Микробиологическая чистота» категория 3.2.
НД на метод отбора:	ГФ РФ издание Х11 выпуск 2007г. ОФС 42-0067-07 «Микробиологическая чистота»
Условия транспортировки:	условия не указаны
Вид упаковки:	ПЭП банка
Количество (шт., вес, объем):	36 г
Пробу отобрал (должность, Ф.И.О.):	Отобрано и доставлено заказчиком.
Дополнительные сведения:	Оказание платных услуг

Протокол испытания распространяется только на образцы, подвергнутые испытанию

Протокол испытаний не может быть частично воспроизведен без письменного разрешения лаборатории

Лицо, ответственное за оформление протокола:



Е.Г. Зеленина

Микробиологические исследования 1020.1.15.12.					
Регистрационный № 3					
Условия проведения испытаний: Температура: 25,4°C; Влажность: 12,7%.					
№ п/п	Наименование показателей	Результаты исследований	Гигиенический норматив	Единицы измерения	НД на методы исследований
1	Общее число аэробных бактерий	2,4 x 10 ² в 1г	не более 10 ⁴ в 1г	кое/г	Государственная фармакопея Российской Федерации изд Х11, 2007г. ОФС 42-0067-07 «Микробиологическая чистота»
2	Общее число грибов	менее 10 ¹ в 1г	не более 10 ² в 1г	кое/г	
3	Escherichia coli	в 1 г не обнаружена	в 1 г не допускается	-	
4	Pseudomonas aeruginosa	в 1 г не обнаружена	в 1 г не допускается	-	
5	Staphylococcus aureus	в 1 г не обнаружен	в 1 г не допускается	-	
6	Энтеробактерии	менее 10 ¹ в 1г	не более 10 ² в 1г	-	
7	Сальмонеллы	в 10г не обнаружены	в 10г не допускаются	-	
Средства измерений, применяемые при исследовании:					
№ п/п	Наименование средства измерения, марка	Заводской номер	Свидетельство о поверке		
			Номер	Поверено до	
1	весы электронные SHIMADZU ELB-200	D515600817	024309	10.11.2016г	

Заведующий МБЛ:



Е.Б. Халяпин

Дата: «22» декабря 2015г.

Протокол имеет право подписывать один из нижеперечисленных:

Руководитель ИЛЦ:

А.В. Короткевич

Зам. руководителя ИЛЦ:

С.А. Маримьянов



Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Барнаульский филиал
Федерального бюджетного учреждения здравоохранения
«Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту»

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ ЦЕНТР

Фактический адрес: 656031, г. Барнаул, ул. Привокзальная, 47
Телефон/факс: (3852) 29-20-84, 62-77-96
E-mail sesgd@mail.ru

Аттестат аккредитации
№ РОСС RU.0001.512081 от 26.08.2013г
Действителен до 26.08.2018г

ПРОТОКОЛ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ № 1021
от « 22 » декабря 2015г

Наименование пробы (образца):	панты марала измельченные (серия № 2) в капсулах
Код пробы:	1021.1.15.12.
Дата изготовления:	2015г
Дата и время отбора:	16.12.2015г. в 09.00
Дата и время доставки:	16.12.2015г. в 10.00
Наименование изготовителя, адрес:	не указано
Наименование организации (Заказчик), юридический адрес:	чл Земцова Н.П. г. Барнаул, ул. Баумана, 39
Наименование объекта, фактический адрес:	чл Земцова Н.П. г. Барнаул, ул. Баумана, 39
Место отбора:	не указано
Цель исследования (СанПиН, ГОСТ и др):	на соответствие: ГФ РФ издание Х11 выпуск 2007г. ОФС 42-0067-07 «Микробиологическая чистота» категория 3.2.
НД на метод отбора:	ГФ РФ издание Х11 выпуск 2007г. ОФС 42-0067-07 «Микробиологическая чистота»
Условия транспортировки:	условия не указаны
Вид упаковки:	ПЭП банка
Количество (шт., вес, объем):	40 г
Пробу отобрал (должность, Ф.И.О.):	Отобрано и доставлено заказчиком.
Дополнительные сведения:	Оказание платных услуг

Протокол испытания распространяется только на образцы, подвергнутые испытанию

Протокол испытаний не может быть частично воспроизведен без письменного разрешения лаборатории

Лицо, ответственное за оформление протокола:



Е.Г. Зеленина

Микробиологические исследования 1021.1.15.12.					
Регистрационный № 4					
Условия проведения испытаний: Температура: 25,4°C; Влажность: 12,7%.					
№ п/п	Наименование показателей	Результаты исследований	Гигиенический норматив	Единицы измерения	НД на методы исследований
1	Общее число аэробных бактерий	4,1 x 10 ² в 1г	не более 10 ⁴ в 1г	Кое/г	Государственная фармакопея Российской Федерации изд Х11, 2007г. ОФС 42-0067-07 «Микробиологическая чистота»
2	Общее число грибов	менее 10 ¹ в 1г	не более 10 ² в 1г	Кое/г	
3	Escherichia coli	в 1 г не обнаружена	в 1 г не допускается	-	
4	Pseudomonas aeruginosa	в 1 г не обнаружена	в 1 г не допускается	-	
5	Staphylococcus aureus	в 1 г не обнаружен	в 1 г не допускается	-	
6	Энтеробактерии	менее 10 ¹ в 1г	не более 10 ² в 1г	-	
7	Сальмонеллы	в 10г не обнаружены	в 10г не допускаются	-	
Средства измерений, применяемые при исследовании:					
№ п/п	Наименование средства измерения, марка	Заводской номер	Свидетельство о поверке		
			Номер	Поверено до	
1	весы электронные SHIMADZU ELB-200	D515600817	024309	10.11.2016г	

Заведующий МБЛ:

Е.Б. Халяпин

Дата: «22» декабря 2015г.

Протокол имеет право подписывать один из нижеперечисленных:

Руководитель ИЛЦ:

А.В. Короткевич

Зам. руководителя ИЛЦ:

С.А. Маримьянов



Исследование стабильности марала пантов измельченных в течение срока хранения

Но- мер серии	Дата первич- ного анализа (заклад- ки на хране- ние) и пере- контроля	Описание	Подлинность, метод ВЭЖХ	Количественное определение, % метод ВЭЖХ			Размер частиц	Потеря в массе при высушива- нии, %	Зола общая, %	Микробиоло- гическая чистота (количество бактерий в навеске препарата)	Продол- жительность хранения, год	Отклонения от требований НД и выводы по хранению
				глицин	аланин	пролин						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	22.06.14.	Однородный порошок красного цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом.	На хроматограмме наблюдается 16 пиков производных аминокислот, в том числе три пика с ($\tau=7,81$; 11,34; 12,42), которые соответствуют пиками СО глицин, аланин, пролин (SD<0,5%)	6,36±0,02	2,52±0,04	4,75±0,03	Фракция с размером частиц: от 0,2 мм до 0,3 мм - 83,31 %, от 0,2 мм до 0,1 мм - 15,24%, до 0,1 мм -1,45 %.	6,65±0,05	32,38±0,14	Категория ЗБ. Не более 104 КОЕ/г аэробных бактерий, не более 102 КОЕ/г дрожжевых и плесневых грибов, не более 102 КОЕ/г бактерий семейства Enterobacteriaceae, при отсутствии Escherichia coli, Staphylococcus aureus (в 1 г), Salmonella (в 10 г).	-	Годен
	20.12.14.	То же	То же	6,78±0,08	2,37±0,03	4,45±0,05	То же	6,76±0,08	35,75±0,23	То же	0,5	Годен
	23.06.15.	То же	То же	6,51±0,07	2,28±0,04	4,37±0,07	То же	6,24±0,02	33,52±0,35	То же	1,0	Годен
	22.12.15.	То же	То же	6,39±0,03	2,72±0,05	4,26±0,02	То же	6,58±0,04	34,61±0,42	То же	1,5	Годен

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
2	22.06.14.	Однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом.	На хроматограмме наблюдается 16 пиков производных аминокислот, в том числе три пика с ($\tau=7,81$; 11,34; 12,42), которые соответствуют пиками СО глицин, аланин, пролин (SD<0,5%)	6,39±0,05	2,46±0,08	4,72±0,08	Фракция с размером частиц: от 0,2 мм до 0,3 мм -82,54 %, от 0,2 мм до 0,1 мм – 15,81%, до 0,1 мм - 1,65 %.	6,32±0,12	33,42±0,38	Категория ЗБ. Не более 104 КОЕ/г аэробных бактерий, не более 102 КОЕ/г дрожжевых и плесневых грибов, не более 102 КОЕ/г бактерий семейства Enterobacteriaceae, при отсутствии Escherichia coli, Staphylococcus aureus (в 1 г), Salmonella (в 10 г).	-	Годен
				6,37±0,08	2,66±0,04	4,43±0,03		6,56±0,08	35,65±0,18		0,5	
				6,55±0,07	2,18±0,06	4,38±0,07		6,29±0,09	33,52±0,24		1,0	
				5,78±0,09	2,72±0,05	4,16±0,09		6,54±0,10	34,61±0,16		1,5	
20.12.14.	То же	То же	6,37±0,08	2,66±0,04	4,43±0,03	То же	6,56±0,08	35,65±0,18	То же	0,5	Годен	
23.06.15.	То же	То же	6,55±0,07	2,18±0,06	4,38±0,07	То же	6,29±0,09	33,52±0,24	То же	1,0	Годен	
22.12.15.	То же	То же	5,78±0,09	2,72±0,05	4,16±0,09	То же	6,54±0,10	34,61±0,16	То же	1,5	Годен	
3	22.06.14.	Однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом.	На хроматограмме наблюдается 16 пиков производных аминокислот, в том числе три пика с ($\tau=7,81$; 11,34; 12,42), которые соответствуют пиками СО глицин, аланин, пролин (SD<0,5%)	6,34±0,06	2,24±0,06	4,68±0,06	Фракция с размером частиц: от 0,2 мм до 0,3 мм -84,35 %, от 0,2 мм до 0,1 мм – 13,86%, до 0,1 мм - 1,79 %.	6,62±0,13	33,42±0,15	Категория ЗБ. Не более 104 КОЕ/г аэробных бактерий, не более 102 КОЕ/г дрожжевых и плесневых грибов, не более 102 КОЕ/г бактерий семейства Enterobacteriaceae, при отсутствии Escherichia coli, Staphylococcus aureus (в 1 г), Salmonella (в 10 г).	-	Годен
				7,10±0,08	2,64±0,08	4,13±0,03		6,36±0,10	35,75±0,12		0,5	
				6,35±0,12	2,46±0,03	4,39±0,05		6,52±0,09	32,68±0,09		1,0	
				5,88±0,09	2,75±0,05	4,18±0,09		6,24±0,12	34,84±0,14		1,5	
20.12.14.	То же	То же	7,10±0,08	2,64±0,08	4,13±0,03	То же	6,36±0,10	35,75±0,12	То же	0,5	Годен	
23.06.15.	То же	То же	6,35±0,12	2,46±0,03	4,39±0,05	То же	6,52±0,09	32,68±0,09	То же	1,0	Годен	
22.12.15.	То же	То же	5,88±0,09	2,75±0,05	4,18±0,09	То же	6,24±0,12	34,84±0,14	То же	1,5	Годен	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
4	22.06.14.	Однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом.	На хроматограмме наблюдается 16 пиков производных аминокислот, в том числе три пика с ($\tau=7,81$; 11,34; 12,42), которые соответствуют пиками СО глицин, аланин, пролин (SD<0,5%)	6,32±0,04	2,16±0,08	4,78±0,05	Фракция с размером частиц: от 0,2 мм до 0,3 мм - 83,44 %, от 0,2 мм до 0,1 мм - 15,08%, до 0,1 мм -1,48 %.	6,62±0,12	33,54±0,22	Категория ЗБ. Не более 104 КОЕ/г аэробных бактерий, не более 102 КОЕ/г дрожжевых и плесневых грибов, не более 102 КОЕ/г бактерий семейства Enterobacteriaceae, при отсутствии Escherichia coli, Staphylococcus aureus (в 1 г), Salmonella (в 10 г).	-	Годен
	20.12.14.	То же	То же	6,34±0,07	2,63±0,05	4,46±0,04	То же	6,56±0,08	34,74±0,16	То же	0,5	Годен
	23.06.15.	То же	То же	6,53±0,06	2,55±0,03	4,32±0,07	То же	6,29±0,14	33,52±0,24	То же	1,0	Годен
	22.12.15.	То же	То же	5,71±0,09	2,79±0,04	4,18±0,08	То же	6,54±0,11	34,61±0,16	То же	1,5	Годен
5	22.06.14.	Однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом.	На хроматограмме наблюдается 16 пиков производных аминокислот, в том числе три пика с ($\tau=7,81$; 11,34; 12,42), которые соответствуют пиками СО глицин, аланин, пролин (SD<0,5%)	6,34±0,06	2,24±0,06	4,68±0,06	Фракция с размером частиц: от 0,2 мм до 0,3 мм - 85,14 %, от 0,2 мм до 0,1 мм - 13,21%, до 0,1 мм -1,65 %.	6,62±0,13	33,42±0,09	Категория ЗБ. Не более 104 КОЕ/г аэробных бактерий, не более 102 КОЕ/г дрожжевых и плесневых грибов, не более 102 КОЕ/г бактерий семейства Enterobacteriaceae, при отсутствии Escherichia coli, Staphylococcus aureus (в 1 г), Salmonella (в 10 г).	-	Годен
	20.12.14.	То же	То же	7,10±0,08	2,64±0,08	4,13±0,03	То же	6,36±0,10	35,75±0,12	То же	0,5	Годен
	23.06.15.	То же	То же	6,35±0,12	2,46±0,03	4,39±0,05	То же	6,52±0,09	32,68±0,08	То же	1,0	Годен
	22.12.15.	То же	То же	5,88±0,09	2,75±0,05	4,18±0,09	То же	6,24±0,12	36,80±0,14	То же	1,5	Годен

Исследование стабильности капсул «Пантокап 0,20» в течение срока хранения

Ном ер сери и	Дата первичного анализа (закладки на хранение) и переконтроля	Описание	Подлинность, метод ВЭЖХ	Количественное определение, метод ВЭЖХ			Средняя масса	Распадаемость, мин	Микробиоло- гическая чистота (количество бактерий в навеске препарата)	Продол- жительность хранения, год	Отклоне- ния от требован ий НД и выводы по хранению
				глицин	аланин	пролин					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	22.06.14.	Твердые капсулы № 1, цилиндрической формы, состоящие из корпуса и крышечки синего цвета, с гладкой поверхностью, без запаха. Содержимое капсул: однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом.	На хроматограмме содержимого капсул после расщеплении пептидных связей белка в ходе кислотного гидролиза с последующей модификацией аминокислот раствором ФИТЦ, наблюдается 16 пиков производных аминокислот, в том числе три пика со временем удерживания $\tau=7,81$; $\tau=11,34$; $\tau=12,42$, которые соответствуют пиками СО глицин, аланин, пролин соответственно. (SD<0,5%)	0,0016± 0,0003	0,00110± 0,0002	0,00060± 0,0002	0,425	9,42±0,21	Категория ЗБ. Не более 104 КОЕ/г аэробных бактерий, не более 102 КОЕ/г дрожжевых и плесневых грибов, не более 102 КОЕ/г бактерий семейства Enterobacteriaceae, при отсутствии Escherichia coli, Staphylococcus aureus (в 1 г), Salmonella (в 10 г).	-	Годен
	20.12.14.	То же	То же	0,0018± 0,0002	0,00105± 0,0003	0,00066± 0,0004	0,426	9,50±0,23	То же	0,5	Годен
	23.06.15.	То же	То же	0,0015± 0,0004	0,0019± 0,0005	0,00064± 0,0002	0,426	9,46±0,18	То же	1,0	Годен
	22.12.15.	То же	То же	0,0019 ±0,0003	0,0016± 0,0005	0,00068 ±0,0005	0,424	9,46±0,16	То же	1,5	Годен
2	22.06.14.	Твердые капсулы № 1, цилиндрической формы, состоящие из корпуса и крышечки синего цвета, с гладкой поверхностью, без запаха. Содержимое	На хроматограмме содержимого капсул после расщеплении пептидных связей белка в ходе кислотного гидролиза с	0,0016± 0,0003	0,00112± 0,0002	0,00064± 0,0001	0,426	9,40±0,11	Категория ЗБ. Не более 104 КОЕ/г аэробных бактерий, не более 102 КОЕ/г дрожжевых и плесневых грибов,	-	Годен

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		капсул: однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом.	последующей модификацией аминокислот раствором ФИТЦ, наблюдается 16 пиков производных аминокислот, в том числе три пика со временем удерживания $\tau=7,81$; $\tau=11,34$; $\tau=12,42$, которые соответствуют пиками СО глицин, аланин, пролин соответственно. (SD<0,5%)						не более 102 КОЕ/г бактерий семейства Enterobacteriaceae, при отсутствии Escherichia coli, Staphylococcus aureus (в 1 г), Salmonella (в 10 г).	-	
	20.12.14.	То же	То же	0,0014± 0,0003	0,00110± 0,0004	0,00060± 0,0004	0,424	9,50±0,23	То же	0,5	Годен
	23.06.15.	То же	То же	0,0017± 0,0005	0,0018± 0,0005	0,00062± 0,0002	0,424	9,50±0,24	То же	1,0	Годен
	22.12.15.	То же	То же	0,0019 ±0,0003	0,0014± 0,0002	0,00061 ±0,0005	0,422	9,46±0,14	То же	1,5	Годен
3		Твердые капсулы № 1, цилиндрической формы, состоящие из корпуса и крышечки синего цвета, с гладкой поверхностью, без запаха. Содержимое капсул: однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом.	На хроматограмме содержимого капсул после расщеплении пептидных связей белка в ходе кислотного гидролиза с последующей модификацией аминокислот раствором ФИТЦ, наблюдается 16 пиков производных аминокислот, в том числе три пика со временем удерживания $\tau=7,81$; $\tau=11,34$; $\tau=12,42$, которые соответствуют пиками СО глицин, аланин, пролин соответственно. (SD<0,5%)	0,0014± 0,0003	0,00112± 0,0002	0,00060± 0,0002	0,426	9,43±,14	Категория ЗБ. Не более 104 КОЕ/г аэробных бактерий, не более 102 КОЕ/г дрожжевых и плесневых грибов, не более 102 КОЕ/г бактерий семейства Enterobacteriaceae, при отсутствии Escherichia coli, Staphylococcus aureus (в 1 г), Salmonella (в 10 г).	-	Годен
	20.12.14.	То же	То же	0,0016± 0,0002	0,00105± 0,0003	0,00065± 0,0004	0,427	9,50±0,25	То же	0,5	Годен
	23.06.15.	То же	То же	0,0015±	0,0019±	0,00068±	0,427	9,50±0,14	То же	1,0	Годен

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	22.12.15.	То же	То же	0,0004 0,0014 ±0,0001	0,0005 0,0016± 0,0005	0,0002 0,00064 ±0,0002	0,424	9,46±0,16	То же	1,5	Годен
4	22.06.14.	Твердые капсулы № 1, цилиндрической формы, состоящие из корпуса и крышечки синего цвета, с гладкой поверхностью, без запаха. Содержимое капсул: однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом.	На хроматограмме содержимого капсул после расщеплении пептидных связей белка в ходе кислотного гидролиза с последующей модификацией аминокислот раствором ФИТЦ, наблюдается 16 пиков производных аминокислот, в том числе три пика со временем удерживания $\tau=7,81$; $\tau=11,34$; $\tau=12,42$, которые соответствуют пиками СО глицин, аланин, пролин соответственно. (SD<0,5%)	0,0019± 0,0003	0,00110± 0,0002	0,00068± 0,0002	0,425	9,50±,15	Категория 3Б. Не более 104 КОЕ/г аэробных бактерий, не более 102 КОЕ/г дрожжевых и плесневых грибов, не более 102 КОЕ/г бактерий семейства Enterobacteriaceae, при отсутствии Escherichia coli, Staphylococcus aureus (в 1 г), Salmonella (в 10 г).	-	
	20.12.14.	То же	То же	0,0015± 0,0002	0,00106± 0,0003	0,00066± 0,0004	0,426	9,50±0,25	То же	0,5	
	23.06.15.	То же	То же	0,0012± 0,0004	0,0018± 0,0005	0,00062± 0,0001	0,426	9,48±0,12	То же	1,0	
	22.12.15.	То же	То же	0,0018 ±0,0003	0,0016± 0,0005	0,00068 ±0,0001	0,422	9,45±0,24	То же	1,5	
5	22.06.14.	Твердые капсулы № 1, цилиндрической формы, состоящие из корпуса и крышечки синего цвета, с	На хроматограмме содержимого капсул после расщеплении пептидных связей белка в	0,0018± 0,0006	0,0014± 0,0001	0,00064± 0,0005	0,422	9,43±,12	Категория 3Б. Не более 104 КОЕ/г аэробных бактерий, не более	-	Годен

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5		гладкой поверхностью, без запаха. Содержимое капсул: однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом.	ходе кислотного гидролиза с последующей модификацией аминокислот раствором ФИТЦ, наблюдается 16 пиков производных аминокислот, в том числе три пика со временем удерживания $\tau=7,81$; $\tau=11,34$; $\tau=12,42$, которые соответствуют пиками СО глицин, аланин, пролин соответственно. (SD<0,5%)						102 КОЕ/г дрожжевых и плесневых грибов, не более 102 КОЕ/г бактерий семейства Enterobacteriaceae, при отсутствии Escherichia coli, Staphylococcus aureus (в 1 г), Salmonella (в 10 г).		
	20.12.14.	То же	То же	0,0017± 0,0002	0,0014± 0,0002	0,00062± 0,0001	0,425	9,50±0,25	То же	0,5	Годен
	23.06.15.	То же	То же	0,0013± 0,0004	0,0019± 0,0005	0,00068± 0,0002	0,425	9,50±0,25	То же	1,0	Годен
	22.12.15.	То же	То же	0,0015 ±0,0003	0,0014± 0,0004	0,00063 ±0,0002	0,424	9,46±0,34	То же	1,5	Годен

Проект

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Регистрационное удостоверение № _____

Дата регистрации «____» _____ 20__ г.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

№ _____

Панты марала измельченные
(торговое наименование лекарственного препарата)

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ФАСОВЩИК
(ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ)
УПАКОВКА)

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ
КАЧЕСТВА

**Спецификация показателей качества
«Панты марала измельченные»**

Наименование показателя	Методы анализа	Нормы
Описание: -цвет -запах	Органолептически, микроскопически	Однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом. Под микроскопом (увеличение в 100 раз) видны частицы различной формы, красно-коричневого цвета с серыми включениями костно-хрящевой ткани.
Подлинность аминокислоты	ВЭЖХ	На хроматограмме наблюдается 16 пиков производных аминокислот, в том числе три пика с ($\tau=7,81; 11,34; 12,42$), которые соответствуют пикам СО глицин, аланин, пролин ($SD<0,5\%$)
Количественное определение (глицина, аланина, пролина)	ВЭЖХ	Содержание аминокислот: глицина не менее 5%, аланина не менее 2%. пролина не менее 4%.
Размер частиц	ГФ XIII изд., том 1, ОФС.1.1.0015.15	Фракция с размером частиц до 0,3 мм, пылевидной фракции не более 2%
Потеря в массе при высушивании, %	ГФ XIII изд., том 1, ОФС.1.2.1.0010.15	Не более 7%
Содержание золы общей, %	ГФ XIII изд., том 1, ОФС.1.2.2.2.0013.15	Не более 36%
Микробиологическая чистота	ГФ XIII изд., том 1, ОФС.1.2.4.0002.15	Категория ЗБ
Упаковка	Упаковка в банку полимерную укупоренную крышкой винтовой по ГОСТ 32626-2014. На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86. Групповая упаковка и транспортная тара в соответствии с ГОСТ 17768-90.	
Маркировка	В соответствии с ГОСТ 14192-96	
Транспортирование	В соответствии с ГОСТ 17768-90	
Хранение	В хорошо укупоренной таре, защищённом от света месте (влажность не более 60%), при температуре от 15-25 °С	
Срок годности	1 год	

Проект

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Регистрационное удостоверение № _____

Дата регистрации « ____ » _____ 20__ г.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

№ _____

Пантокап

(торговое наименование лекарственного препарата)

международное непатентованное или химическое наименование

капсулы 0,20

лекарственная форма, дозировка

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ФАСОВЩИК
(ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ)
УПАКОВКА)

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ
КАЧЕСТВА

**Спецификация показателей качества
капсулы «Пантокап 0,20»**

Наименование показателя	Методы анализа	Нормы
Описание	Органолептически	Твердые капсулы № 1, цилиндрической формы, состоящие из корпуса и крышечки синего цвета, с гладкой поверхностью, без запаха. Содержимое капсул: однородный порошок красно-коричневого цвета с бурым оттенком, с серыми включениями неправильной прямоугольной формы, характерным запахом.
Подлинность аминокислоты	ВЭЖХ	На хроматограмме содержимого капсул после расщепления пептидных связей белка в ходе кислотного гидролиза с последующей модификацией аминокислот раствором ФИТЦ, должно наблюдаться 16 пиков производных аминокислот, в том числе три пика со временем удерживания 7,81; 11,34; 12,42, которые соответствуют пиками СО глицин, аланин, пролин соответственно.
Количественное определение	ВЭЖХ	Содержание глицина - не менее 0,0014 г, аланина не менее 0,00103 г, пролина не менее 0,00061 г.
Средняя масса	Весовой из 20 капсул. ГФ XIII изд., Том 2, ОФС.1.4.2.009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм»	От 0,415 г до 0,427 г
Распадаемость	ГФ XIII изд., Том 2, ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул»	Не более 30 мин
Растворение	ГФ XIII изд., Том 2, ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм»	Не менее 75+5 %
Микробиологическая чистота	ГФ XIII изд., том 1, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота»	Категории ЗБ
Упаковка	Упаковка по 30 капсул в банку полимерную укупоренную крышкой с винтовой горловиной по ГОСТ 32626-2014. На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86. Групповая упаковка и транспортная тара в соответствии с ГОСТ 17768-90.	
Маркировка	В соответствии с ГОСТ 14192-96	
Транспортировка	В соответствии с ГОСТ 17768-90	
Хранение	В хорошо укупоренной таре, защищённом от света месте влажность не более 60%, при температуре от 15-25 °С	
Срок годности	1 год	

Утверждаю
Директор
ООО «Алтайдар»



Лунин П.А.

2018 г.

Акт проведения апробации технологии капсул Пантокап

В ООО «Алтайдар» (г. Барнаул) проведена апробация технологии получения капсул «Пантокап» по схеме лабораторного регламента, предложенного кафедрой фармации ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, который включает следующие стадии:

- ВР. 1. Санитарная подготовка производства
- ВР. 2. Подготовка сырья и капсул
- ТП. 3. Получение капсулируемой массы
- ТП. 4. Наполнение и отбраковка капсул
- УМО. 5. Фасовка, упаковка, маркировка



Готовый продукт

Апробация показала полное соответствие показателей качества полученных капсул Пантокап требованиям проекта НД 42- «Пантокап капсулы 0,20», а также рациональность и воспроизводимость предложенной технологии и возможность ее использования в промышленных условиях.

Разработанный лабораторный регламент может являться основой составления опытно-промышленного и промышленного регламента.

Директор ООО «Алтайдар»

П.А. Лунин

Главный технолог ООО «Алтайдар»

Н.В. Пушкарева

УТВЕРЖДАЮ
Директор
ООО «Алтайдар»
Лунин П.А.
«09» _____ 2018 г.



**ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ
НА ПРОИЗВОДСТВО
пантов марала измельченных**

2018

РАЗДЕЛ X. БЕЗОПАСНОСТЯ ЭКСПЛУАТАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА

Панты марала измельченные готовят при соблюдении правил работы с используемым оборудованием, инструкций по технике безопасности, охране труда и противопожарным мероприятиям.

Директор
ООО «Алтайдар»
к. фарм. наук



П.А. Лунин

« 09 » 04 2018г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор
ООО «Алтайдар»
Лунин П.А.
«17» _____ 2018 г.



**ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ
НА ПРОИЗВОДСТВО
капсул «Пантокап 0,20»**

2018

Таблица 6 (продолжение)

1	2	3
Распадаемость	ГФ XIII изд., Том 2, ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул»	Не более 30 мин
Микробиологическая чистота	ГФ XIII изд., том 1, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота»	Категории ЗБ

РАЗДЕЛ X. БЕЗОПАСНОСТЯЯ ЭКСПЛУАТАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА

Капсулы «Пантокап 0,20» получают при соблюдении правил работы с используемым оборудованием, инструкций по технике безопасности, охране труда и противопожарным мероприятиям.

Директор
ООО «Алтайдар»
к. фарм. наук



П.А. Лунин

« 17 » 04 2018г.



Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Центральная научно-производственная
ветеринарная радиологическая лаборатория»
Юридический адрес:
656056, Алтайский край, г. Барнаул, ул. Максима Горького, 4 В;
тел. (8-3852) 24-25-48
www.fgu-radiovetlab.ru
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ
Фактический адрес:
656049, Алтайский край, г. Барнаул, ул. Ползунова, 36 А;
тел. (8-3852) 63-65-15, факс (8-3852) 63-34-08
e-mail: cnpvrl_224@mail.ru



Утверждаю:
Заместитель директора
(Руководитель ИЛ)
А. В. Безматерных

Аттестат аккредитации испытательной лаборатории №РОСС RU.0001.21ПШ40 от 05.08.2014 г.

Протокол испытаний № 400/4940 от 21.11.2018 , Редакция: 1

При исследовании образца: Панты марала измельченные образец № 2
принадлежащего: Земцова Наталья Петровна, Российская Федерация, Алтайский край, г. Барнаул, Казакова ул., д. 18
заказчик: Земцова Наталья Петровна, Российская Федерация, Алтайский край, г. Барнаул, Казакова ул., д. 18
место отбора проб: Российская Федерация, Республика Алтай, с. Черга
НД, регламентирующий правила отбора: нет информации
производство: Российская Федерация, Республика Алтай, с. Черга
количество проб: 1 проба
дата поступления: 15.11.2018
даты проведения испытаний: 16.11.2018 - 21.11.2018
на соответствие требованиям: Инструктивное письмо № 1242/1041 О порядке радиационного контроля за пищевым сырьем и продовольственными товарами
получен следующий результат:

№ п/п	Наименование показателя	Ед. изм.	Результат испытаний	Погрешность (неопределенность)	Норматив	НД на метод испытаний
Взг. Радионуклиды						
1	Стронций 90	Бк/кг	0,0	7,0	-	МРК № 40152.4ДЗ62/01.00294-2010 - Сцинтилляционный бета-спектрометр с программным обеспечением «ПРОГРЕСС». Методика измерения активности радионуклидов
2	Цезий 137	Бк/кг	18,1	7,2	не более 600,0	МВИ 40090.3Н700 - Методика измерения активности радионуклидов с использованием сцинтилляционного гамма-спектрометра с программным обеспечением "ПРОГРЕСС"

Применяемое оборудование:

№ п/п	Наименование оборудования	Дата поверки/аттестации
1	Установка спектрометрическая МКС-01А "МУЛЬТИРАД"	15.06.2018
2	Установка спектрометрическая МКС-01А "МУЛЬТИРАД"	31.08.2018

Примечание: Результаты испытаний распространяются только на образцы, подвергнутые испытаниям.
Частичная перепечатка или копирование без письменного разрешения лаборатории запрещены.

21.11.2018

Ответственный за оформление протокола: Савельяева Н.В.

«Утверждаю»

И.о. проректора по учебной работе
ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России
Н. Бородина

«» 2019 г.

АКТ

О ВНЕДРЕНИИ В УЧЕБНЫЙ ПРОЦЕСС

Предмет внедрения: Материалы диссертации Земцовой Натальи Петровны на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук на тему: «Разработка технологии и стандартизация препарата общетонизирующего действия на основе марала пантов измельченных».

Кем предложен: Земцовой Н.П.

Источник информации: Информационное письмо «Разработка технологии и стандартизация препарата общетонизирующего действия на основе марала пантов измельченных».

Где и кем внедрено: Кафедра фармации Алтайского государственного медицинского университета.

Цель внедрения: Использование в лекционных и практических курсах по фармацевтической технологии фармацевтического факультета.

Ответственные за внедрение: Профессор кафедры фармации ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России, д.ф.н., профессор Турецкова Вера Феопеновна.

Результаты внедрения: Представленные результаты диссертационной работы используются в разделах – капсулы на основе марала пантов измельченных.

Эффективность внедрения: Материалы, предоставленные в информационном письме, расширили представление о технологии и фармакокинетике капсулированных лекарственных форм.

И.о. зав. кафедрой фармации
ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России, доцент  Л.Г. Дворникова

Зав.учебной частью кафедры
фармации ФГБОУ ВО АГМУ
Минздрава России, доцент  Н.М.Талыкова

Председатель методической комиссии
по специальности «Фармация», ФГБОУ ВО АГМУ
Минздрава России, доцент  В.М. Воробьева