

12. Leikert J.F., Rathel T.R., Wohlfart P., Cheynier V., Vollmar A. M., and V. M. Dirsch Red Wine Polyphenols Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Subsequent Nitric Oxide Release From Endothelial Cells *Circulation*, September 24, 2002; 106(13): 1614 – 1617.

13. Pendurthi U.R., et al. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler. Throb. Vasc. Biol.* 1999 eb; 19 (2):419-426.

14. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension J.B.Laursen, S.Rajagopalan, Z.Galis et al. // *Circulation*. – 1997. – Vol. 95. – P. 588-593.

15. Wallerath T., Deckert G., Ternes T., Anderson H., H. Li, K. Witte, and U. Forstermann Resveratrol, a Polyphenolic Phytoalexin Present in Red Wine, Enhances Expression and Activity of Endothelial Nitric Oxide Synthase *Circulation*, September 24, 2002; 106(13): 1652 – 1658.

УДК 665.3:547.979.8

СТАНДАРТИЗАЦИЯ КАРОТИНСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ «МАСЛО ОБЛЕПИХОВОЕ» И «АЕКОЛ»

А.А. Зинченко¹, Л.В. Кричовская², В.Н. Бузов³

¹ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр»

²НТУ «ХПИ» (г. Харьков), ³ООО «Сайбервижн» (г. Москва)

Изучен жирнокислотный состав образцов концентратов масла облепихового различных производителей и каротинсодержащего препарата «Аекол» по модифицированной методике, исключаяющей окисление ненасыщенных жирных кислот. Полученные результаты позволили предложить новый критерий качества препарата, использование которого позволяет достаточно надежно выявлять фальсифицированные и некачественные препараты.

Препараты на основе каротина (концентрат масла облепихового, получаемого из плодов облепихи, и «Аекол» на основе микробиологического каротина), обладают противовоспалительным и репаративным действием и часто используются при лечении термических и химических ожогов, лучевых поражений кожи и слизистых оболочек, применяются для комплексной терапии язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки [1,2]. Относительно высокая стоимость этих препаратов, их широкий спрос и популярность применения лекарственных средств на основе природного растительного сырья спровоцировали появление в аптечной сети Украины, Российской Федерации и других стран СНГ некачественных и фальсифицированных препаратов. Поэтому разработка новых подходов для надежного выявления фальсифицированной продукции является актуальной задачей в сложившейся ситуации.

По действующим в Украине и РФ нормативно-аналитическим документам (НАД) подлинность каротинсодержащего облепихового масла в лекарственных средствах определяют двумя методами. Спектрофотометрическим методом устанавливают наличие каротиноидов, а методом газовой хроматографии, с использованием насадочной колонки, определяют присутствие пальмитолеиновой кислоты, высокое содержание которой характерно для масла облепихи. Такой подход к идентификации препаратов на основе масла облепихи оказывается в настоящее время явно недостаточным, поскольку каротиноиды могут быть получены из другого сырья (например, микробиологически из моркови), а пальмитолеиновая кислота в концентрации до 3,5% часто присутствует в других растительных маслах.

В значительных количествах (до 27%) пальмитолеиновая кислота присутствует в жирах животного происхождения [3]. На основании проведенных исследований явно фальсифицированных препаратов масла облепихового можно сделать заключение, что значительная часть этих препаратов представляют собой раствор микробиологически полученных каротиноидов в подсолнечном масле, возможно с добавками жира животного происхождения.

Для подтверждения такого предположения был взят препарат «Аекол» на основе микробиологического каротина с суммарным содержанием каротиноидов (около 220 мг %). На хроматограмме метиловых эфиров жирных кислот этого образца (рис. 1) явно наблюдается пик метилового эфира пальмитолеиновой кислоты. Таким образом, препарат на основе микробиологического каротина формально полностью соответствует требованиям всем используемым в настоящее время критериям подлинности облепихового масла.

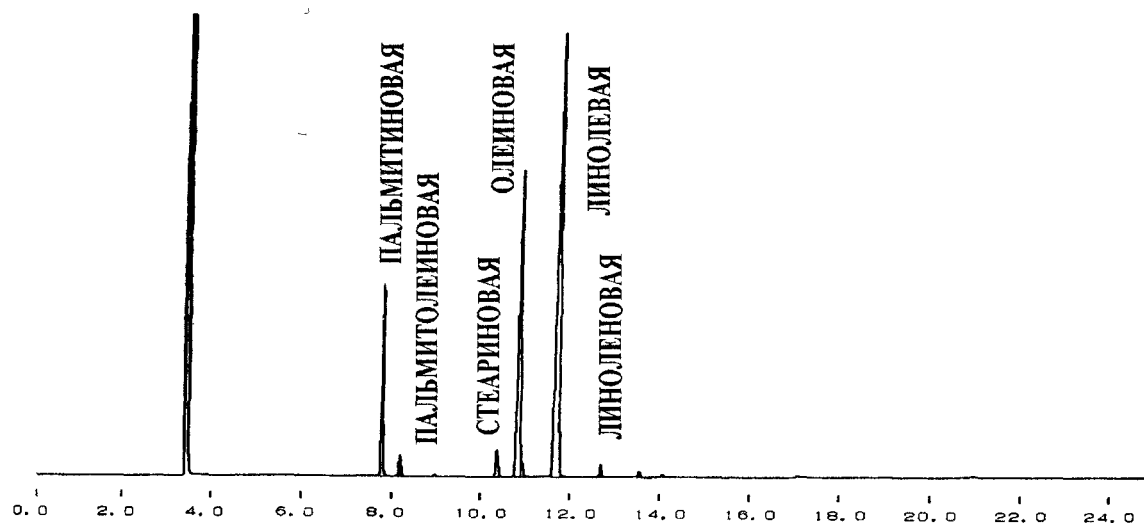


Рис. 1. Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот раствора каротиноидов, полученных микробиологическим методом в подсолнечном масле

Для выявления новых критериев подлинности препаратов на основе облепихового масла были исследованы образцы концентратов полученных из облепихи, выращенной в разных регионах: концентрат ОАО «Алтайвитамины» (г.Бийск, РФ) и концентрат полученный из облепихи Харьковской области (Украина). Все концентраты облепихового масла были получены путем экстракции сырья легко кипящим гексановым растворителем под торговым названием «Нефрас П1-65/71» с температурой кипения до 71 °С по ТУ 38.1011228-90.

Прежде всего, дополнительно, было проведено изучение жирно-кислотного состава концентратов масла облепихового с использованием растворов метиловых эфиров для дальнейшего хроматографирования [4,5].

Хроматографирование проводили на хроматографе GC-14В, оснащенном автоинжектором АОС-14 и интегратором С-R7а, производства фирмы «Shimadzu» (Япония) в двух вариантах условий приведенных в табл. 1. Первые условия были близки к условиям приведенным в действующих в Украине и РФ НАД на концентрат облепихового масла, а вторые – с использованием специализированной для разделения метиловых эфиров жирных кислот капиллярной колонки. Условия подобраны таким образом, чтобы обеспечить максимальное разделение метиловых эфиров жирных кислот [6,7]. В этих же условиях хроматографировали смесь стандартных образцов метиловых эфиров насыщенных жирных кислот C₁₄ – C₂₀, олеиновой кислоты и метиловых эфиров жирных кислот подсолнечного масла. Условия хроматографирования исследуемых растворов метиловых эфиров жирных кислот концентрата масла облепихового и «Аекола»: Т = 190 °С, сорбент-хроматон N AW, размер частиц 0,160 – 0,200 мм, с нанесенной в количестве 9% неподвижной фазой полидиэтиленгликольсукцинат, скорость газаносителя (гелий) – 35 мл/мин.

Типичные хроматограммы метиловых эфиров жирных кислот концентрата масла облепихового, полученные в обоих условиях показаны на рис. 3 и 4.

Как видно на хроматограмме, полученной в условиях 2, сразу за пиком метилового эфира олеиновой кислоты наблюдается дополнительный пик, превосходящий по величине пик метилового эфира олеиновой кислоты. На этой же хроматограмме и на хроматограмме, полученной в условиях 1, между пиками метиловых эфиров пальмитоолеиновой и стеариновой кислот присутствует пик, время удерживания которого близко, но не совпадает со временем удерживания пика метилового эфира гептадекановой кислоты.

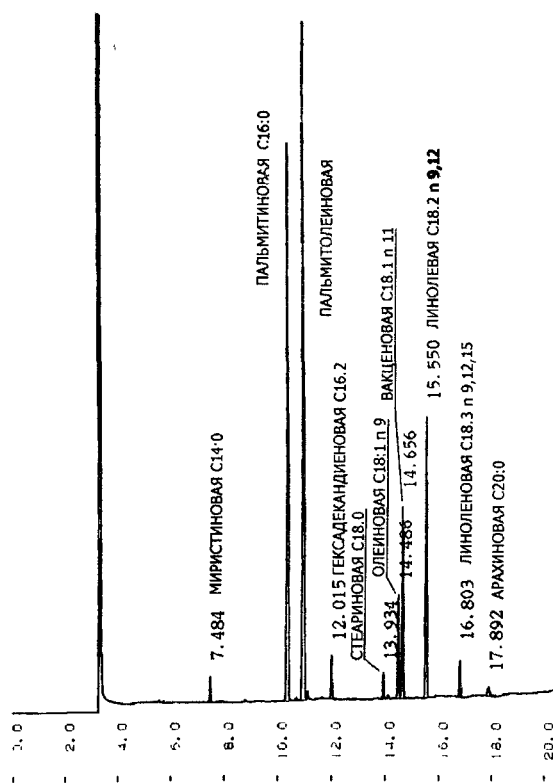


Рис. 3. Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот концентрата масла облепихового, полученная в условиях 2 (капиллярная колонка)

Исходя из положения пиков на хроматограмме, полученной в условиях 2, и сравнивая с хроматограммами стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот и метиловых эфиров подсолнечного масла, можно предположить, что пик, следующий за пиком метилового эфира олеиновой кислоты, принадлежит метилому эфиру цис-вакценовой кислоты.

Пик, который расположен между пиками метиловых эфиров пальмитоолеиновой кислоты и стеариновой кислоты принадлежит метилому эфиру, редко встречающийся в таких количествах в растительных маслах, гексадекадиеновой кислоте.

Пик, который расположен между пиками метиловых эфиров пальмитоолеиновой кислоты и стеариновой кислоты принадлежит метилому эфиру, редко встречающийся в таких количествах в растительных маслах, гексадекадиеновой кислоте.

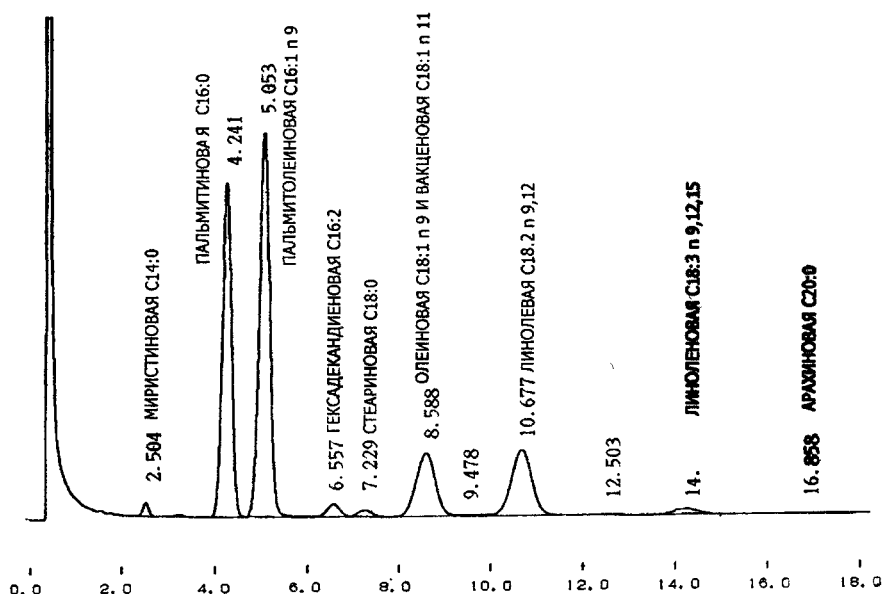


Рис. 4. Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот концентрата масла облепихового, полученная в условиях 1 (капиллярная колонка)

Для подтверждения этого предположения, полученные по описанной выше методике метиловые эфиры жирных кислот растворяли в 2 мл н-ундекана и гидрировали при $T = -120^{\circ}\text{C}$ в присутствии катализатора – пироморфного никеля, полученного путем термического разложения 0,1 г формиата никеля при температуре 130-140 C в атмо-

сфере водорода. Гидрирование проводили в той же установке, в которой получали метиловые эфиры (рис. 2). Вместо инертного газа в капилляр, длина которого была увеличена до дна колбы, подавали со скоростью 10 мл/мин водород. Хроматограммы гидрированных метиловых эфиров жирных кислот показаны на рис. 5.

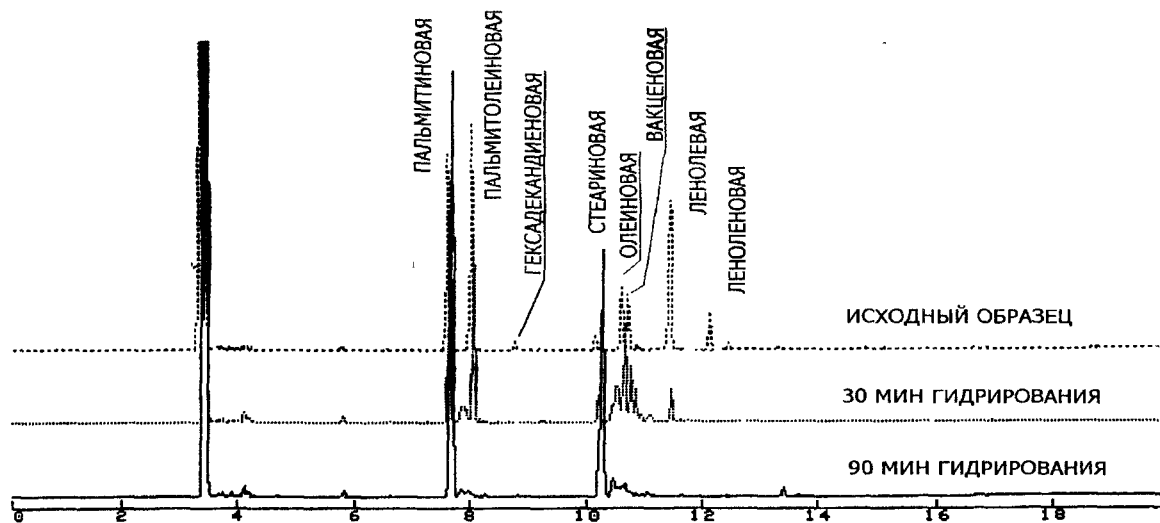


Рис. 5. Хроматограммы метиловых эфиров жирных кислот концентрата масла облепихового, полученные в процессе гидрирования

При сравнении хроматограмм до и после гидрирования видно, что метиловые эфиры пальмитолеиновой кислоты и гексадекадиеновой кислоты гидрируются до метилового эфира пальмитиновой кислоты, а метиловые эфиры олеиновой, вакценовой, линолевой и линоленовой кислот гидрируются до стеариновой кислоты.

Таким образом, было установлено, что пики расположенные за пиком метилового эфира стеариновой кислоты соответствуют метиловым эфирам ненасыщенных жирных кислот, а пик расположенный между пиками метиловых эфиров пальмитолеиновой и стеариновой кислот соответствует метиловому эфиру гексадекадиеновой кислоты.

Интересной особенностью концентрата облепихового масла является значительное преобладание вакценовой кислоты (двойная связь в 11 положении) над олеиновой кислотой (двойная связь в 9 положении). По-видимому, биосинтез ненасыщенных жирных кислот в облепихе в значительных количествах происходит не по преобладающей для большинства растений схеме А [8,9], а по схеме Б с предварительным преобладанием окислительных процессов образования двойных связей над процессами наращивания углеродной цепи. Данную особенность можно использовать для идентификации препаратов содержащих концентрат облепихового масла. В таблице приведены результаты определения состава жирных кислот в исследуемых образцах концентратах масла облепихового.

Таблица

Жирно-кислотный состав различных образцов масла облепихового и «Аекола»

Наименование и обозначение жирной кислоты	Содержание жирной кислоты в % (отн.)			
	Аекол (2003 г.)	АКХ «Облепиховый», РФ (2001 г.)	ОАО «Алтайвитамины» РФ (2001 г.)	Харьковская обл. (Украина) (2001 г.)
C14:0	0,69	0,670	0,62	0,72
C 16:0	29,2	31,2	30,0	33,3
C16:1, n 9	38,3	36,1	37,6	35,0
C16:2, n 9,6,12	1,31	1,3	1,0	1,1
C18:0	1,4	1,3	1,9	1,5
C18:1, n 9	5,0	4,7	5,0	5,2
C18:1, n 11	8,0	8,1	8,3	6,9
C18:2, n 9,12	13,6	13,6	13,3	14,2
C18:3 n 9,12,15	1,5	1,6	1,4	1,5
Другие кислоты	1,0	1,4	0,9	0,5

Как видно из приведенных результатов, во всех исследованных образцах концентрата концентрация пальмитолеиновой кислоты превосходит концентрацию пальмитиновой кислоты, а концентрация вакценовой кислоты превосходит концентрацию олеиновой кислоты. Поэтому, для такого часто фальсифицируемого препарата как масло облепиховое, критерием подлинности может быть не только наличие пиков соответствующих пальмитолеиновой и вакценовой кислот, но и отношение площадей пиков метиловых эфиров кислот пальмитолеиновой и пальмитиновой, а так же вакценовой и олеиновой кислот (рис.6).

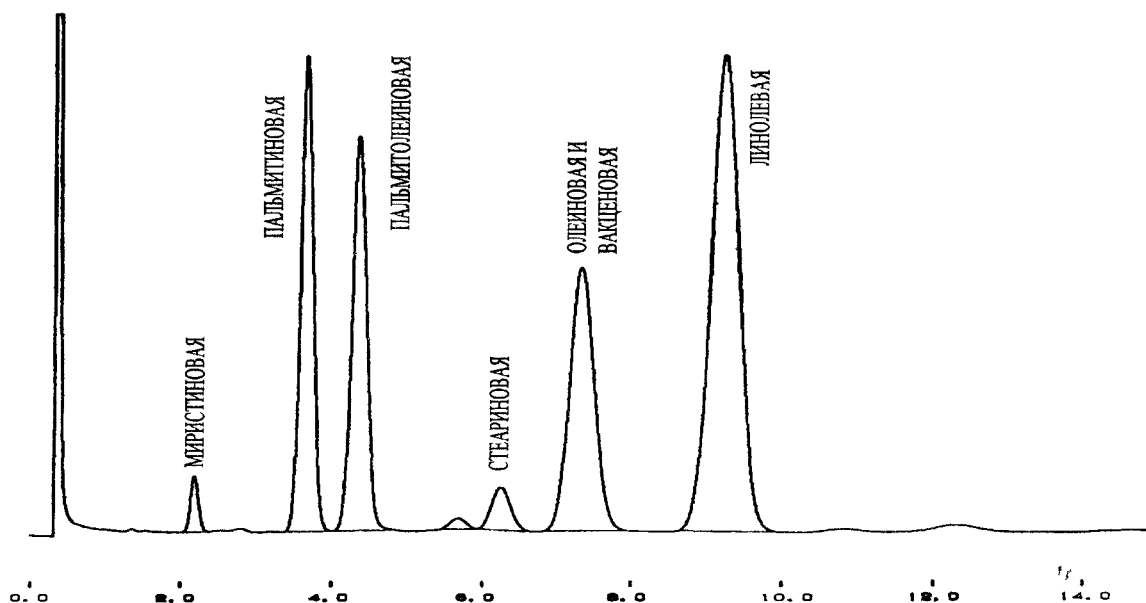


Рис 6 Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот концентрата масла облепихового, полученная в условиях 1 (капиллярная колонка)

Рассчитать значение отношений концентраций пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот для качественного препарата можно, принимая во внимание то, что в действующих НАД на готовые препараты количественное содержание концентрата облепихового масла (или самого масла) оценивается спектрофотометрическим методом по количественному содержанию каротиноидов.

Так, в НАД, действующей на масло облепиховое в РФ и в Украине, указано содержание каротиноидов не менее 180 мг %.

В тоже время максимальная концентрации каротиноидов в концентрате масла облепихового, установленная за период наблюдений более 15 лет, составляет 640 мг %, поэтому при приготовлении готовой лекарственной формы масла облепихового максимально возможное разведение концентрата подсолнечным маслом не должно превышать 3,5.

В самом подсолнечном масле, по требованиям действующего в большинстве стран СНГ ГОСТа 30623-98, содержание пальмитиновой кислоты должно быть в пределах от 5,6 до 7,6 %, а пальмитолеиновой кислоты от 0 до 0,3 %

Исходя из этих данных, и данных приведенных в таблице 1, видно, что максимально возможная концентрация пальмитиновой кислоты в готовом продукте после разведения в 3,5 раза концентрата масла облепихового маслом подсолнечным, может составлять 15%, а минимально возможная концентрация пальмитолеиновой кислоты – 10 %. Следовательно, если оба компонента препарата соответствовали требованиям нормативных документов, максимально допустимое соотношение концентраций пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот в готовой лекарственной форме должно быть не более 1,5.

Рассчитанное таким же образом значение отношения концентраций олеиновой и вакценовых кислот должно быть не более 15.

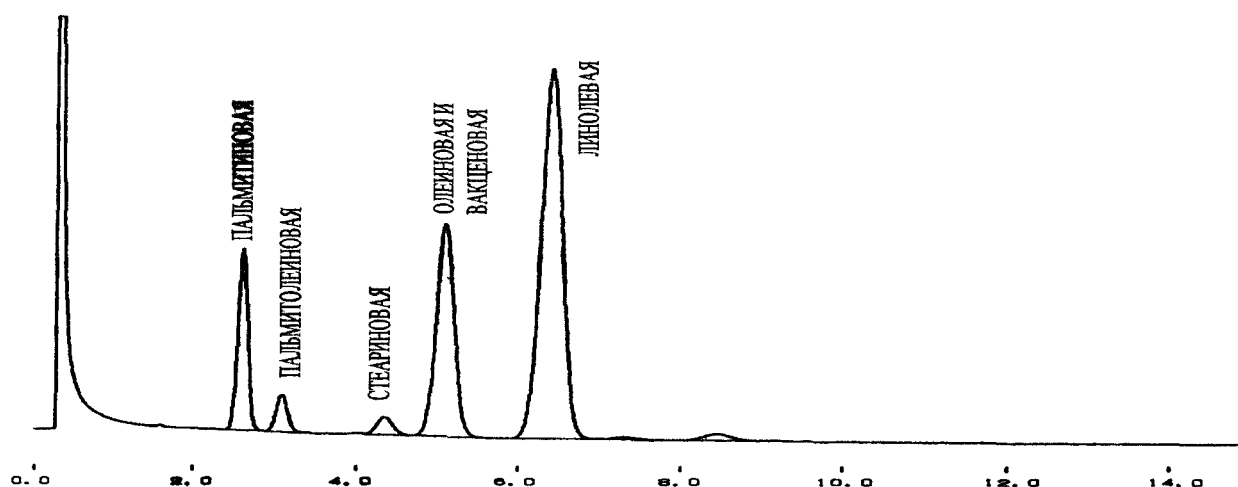


Рис. 8. Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот некачественного образца масла облепихового

Для надежного разделения пиков метиловых эфиров олеиновой и вакценовой кислот необходимо использовать специальную капиллярную колонку, что для большинства предприятий – изготовителей препаратов на основе растительного сырья и контролирующих лабораторий экономически может быть невозможным из-за высокой стоимости колонки (около 1000eur). Поэтому, в качестве основного критерия подлинности препаратов на основе облепихового масла в настоящее время целесообразно использовать наличие на хроматограммах испытуемых образцов пика метилового эфира пальмитолеиновой кислоты и соотношение площадей пиков метиловых эфиров пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот. Предлагаемый критерий оценки качества и подлинности масла облепихового был использован при анализе 12 образцов препарата 5 украинских (7 образцов) и 4 российских производителей.

Результаты анализа показали, что все образцы масла облепихового украинских производителей не соответствовали предлагаемому критерию подлинности, при этом минимальное значение отношения концентраций пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот имело значение 4,5, а в 5 образцах содержание пальмитолеиновой кислоты не превышало 1%.

Из образцов российских производителей 2 образца препарата имели значение отношения концентраций пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот равное 1,02 и 1,50, т.е. практически полностью соответствовали предлагаемому критерию, а остальные образцы имели значение отношения концентраций пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот от 1,77 до 2,4, причем значение 2,4 имел образец не лекарственного препарата, а пищевой добавки, качество которой регламентировано ТУ 9197-065-21-428156-2000 РФ.

Интересно отметить, что полностью соответствовали предлагаемому критерию подлинности только те образцы лекарственного препарата «масло облепиховое», которые были произведены на предприятиях, перерабатывающих растительное сырьё и выпускающих концентрат облепихового масла в качестве сырья для других предприятий. Типичные хроматограммы метиловых эфиров жирных кислот образцов облепихового масла, для которых значение отношения концентраций пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот соответствует и не соответствует предлагаемому критерию показаны на рис. 7 и 8.

Предложенный критерий контроля качества препаратов на основе облепихового масла позволяет более объективно, чем используемые в настоящее время показатели оценить качество препарата, поскольку фармакологические свойства масла облепихо-

вого определяются не только наличием и количеством каротиноидов и ненасыщенных жирных кислот, а и в значительной мере содержанием фитостерина, витаминов и других биологически активных веществ [10], наличие и количество которых в препаратах в действующих НАД не нормируется.

Выводы

1. Проведены исследования жирнокислотного состава концентрата масла облепихового, различных производителей по методике, исключающей окисление ненасыщенных жирных кислот. Методика может быть выполнена как на насадочной, так и на капиллярной колонке и доступна для выполнения в большинстве контрольно-аналитических лабораторий.

2. На основании полученных результатов предложен новый критерий оценки качества облепихового масла – отношение концентраций пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот. Предложенный критерий позволяет объективно выявить фальсифицированные и некачественные препараты.

3. Предлагаемый критерий подлинности препарата применен при анализе 12 образцов масла облепихового, при этом было выявлено, что значительная часть образцов представляют собой фальсифицированные препараты.

Библиографический список

1. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – Харьков: Торгсин, 1997. – Т. 1-2.
2. Кричковская, Л.В. Химия, биохимия и технология биологически активных каротинсодержащих средств на основе растительного масла и жиров / Л.В. Кричковская. – Харьков, 1997. – 210 с.
3. Беззубов, Л.П. Химия жиров / Л.П. Беззубов. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – С. 280.
4. Лурье, А.А. Хроматографические материалы / А.А. Лурье. – М.: Химия, 1978. – 438 с.
5. Дженнингс, В. Подготовка образцов для газохроматографического анализа / В. Дженнингс, А. Рапп. – М.: Мир, 1986. – 116 с.
6. Берчфильд, Г. Газовая хроматография в биохимии / Г. Берчфильд, Э. Сторрс. – М.: Мир, 1964.
7. Коцев, Н. Наръчник по газова хроматография / Н. Коцев, Н. Пецев. – София: Университетско изд. «Св. Клемент Орхидски», 1994. – С.439.
8. Уайт, А. Основы биохимии / А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман. – М.: Мир, 1981. – Т. 1-3.
9. Ленинджер, А. Биохимия / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1976. – С. 957.
10. Цибилова, Д.Ц. К исследованию листьев и шрота облепихи. Биология, химия и фармакология облепихи / Д.Ц. Цибилова, Д.Б. Распутина, Д.Н. Зылыкеева. – Новосибирск: Наука, 1983. – С.107-109.

УДК 665.3:547.979.8

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТОГО СИНТЕЗА ПРОВИТАМИНА А В УСЛОВИЯХ ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

Л.В. Кричковская¹, Е.А. Кунщикова¹, Е.Т. Жиликова², С.И. Чернышов³

¹Национальный технический университет «ХПИ» (г. Харьков)

²Белгородский государственный университет, (г. Белгород)

³Крахмало-паточный комбинат (г. Верхне-Днепровск)

Интерес к производству биологически активных веществ биотехнологическими методами обусловлен, в том числе и экологическим состоянием окружающей среды. В последнее время экологическое состояние почв, снижение ее плодородия и накопление различных источников заболеваний растительного сырья с одновременным снижением посевных площадей, а также отсутствием в Украине плантаций облепихи, заставляют уделять все более пристальное внимание биотехнологическим способам получения биологически активных веществ, например, таких как каротин. Они находят всё более широкое применение при разработке новых лекарственных препаратов. Проблема оптимизации биосинтеза β-каротина привлекает внимание исследователей в связи с расширением области практического применения β-каротина и в народном хозяйстве.