



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
«ХАРКІВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до виконання лабораторних робіт
з курсу

«Біотехнології виробництва готових лікарських форм»

для студентів спеціальності
162 «Біотехнології та біоінженерія»

Затверджено
редакційно-видавничою
радою університету,
протокол № 3 від 06.10.2021 р.

Харків
НТУ «ХПІ»
2021

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу «Біотехнології виробництва готових лікарських форм» для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / уклад. Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : НТУ «ХПІ». – 53 с.

Укладачі Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко

Рецензент Л. В. Кричковська

Кафедра біотехнології, біофізики та аналітичної хімії

ВСТУП

Фармацевтична біотехнологія є пріоритетним напрямком розвитку сучасної фармації. Кожне відкриття біотехнології, імунології, нанобіотехнології та інших наукових напрямів – це черговий крок до створення нових лікарських і профілактичних препаратів. Все це було б неможливо без розвитку сучасної фармацевтичної науки зі створення технологічних основ розробки готових лікарських форм: розчинів для ін'єкцій та інфузій, таблеток, суспензій, мазей, супозиторіїв та інших лікарських форм.

Метою даного видання є поглиблення теоретичних знань та формування практичних навичок одержання біотехнологічних препаратів різних лікарських форм та їх контролю. В методичних вказівках наведено накопичений досвід розробки і впровадження біотехнологічних препаратів, одержаний на кафедрі біотехнології, біофізики та аналітичної хімії протягом багатьох років.

Перед тим, як приступити до виконання лабораторних робіт, здобувач має можливість ознайомитися з теоретичними питаннями та основними новими термінами, а також поглибити свої знання, скориставшись рекомендованою літературою.

У цих методичних вказівках запропоновані три лабораторні роботи: «Дослідження розчину бактеріального декстрана в препараті “Реополіглюкін”»; «Одержання екстрактів за допомогою апарату Сокслета»; «Методи одержання ліпосомальних форм та їх контроль». Запропоновані лабораторні роботи передбачають опанування здобувачами різних технологічних та аналітичних методик: екстракція, екструзія, робота із вакуумом, титриметричний та колориметричний аналіз, хроматографія у тонкому шарі, віскозиметрія та ін.

Кожна лабораторна робота містить контрольні запитання, що дозволяє систематизувати набуті знання та навички.

Лабораторна робота 1. ДОСЛІДЖЕННЯ РОЗЧИНУ БАКТЕРІАЛЬНОГО ДЕКСТРАНА В ПРЕПАРАТІ «РЕОПОЛІГЛЮКІН»

Мета роботи – засвоїти методики вивчення фармакопейних характеристик бактеріальних декстранів та їх лікарських форм: оптичне обертання, віскозиметрія. Провести ідентифікацію продукту, визначити концентрацію речовини і середню молекулярну масу поліглюканів.

Основні завдання:

1. Ідентифікація бактеріальних декстранів.
2. Визначення концентрації декстрану в розчині.
3. Визначення в'язкості і віскозиметричної середньої молекулярної маси.

Таблиця 1.1 – Перелік обладнання та матеріалів, необхідних для проведення лабораторної роботи

Номер завдання	Найменування обладнання та реактивів	1	2	3
Обладнання та матеріали	1. Ваги аналітичні	+	+	
	2. Піпетки 1 мл, 5 мл, 10 мл, 20 мл	+	+	
	3. Склянки 50 мл	+	+	
	4. Пробірки скляні	+		
	5. Папір фільтрувальний	+	+	
	6. Поляриметр		+	
	7. Кварцеві пластинки		+	
	8. Термостат із температурою $25 \pm 0,1$ °С			+
	9. Мірні колби 50 мл			+
	10. Віскозиметр типу ВПЖ-4 (віскозиметр Освальда)			+
	11. Секундомір			+
	12. Водяна баня	+		
	13. Скляні фільтри класу ПОР 16			+
Сировина	1. Декстран або препарат «Реополіглюкін»		+	
Реактиви	1. Кислота хлористоводнева, Р	+		
	2. Розчин мідно-тартратний, Р	+		
	3. Вода очищена, Р	+	+	
	4. Розчин сахарози, Р		+	
	5. 0,9 % розчин натрію хлориду, Р		+	+



ТЕОРЕТИЧНА ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Декстрини – група бактеріальних поліглюканів загальною формулою $(C_6H_{10}O_5)_n$. Декстрини синтезуються із сахарози бактеріями *Leuconostoc mesenteroides* і *Leuconostoc dextranicum* сімейства стрептококів.

Лінійні ділянки декстранів побудовані із залишків α -D-глюкопіранози, де чергуються з 1,3-зв'язками; в інших частинах ланцюга – 1,2; 1,3; 1,4-зв'язки. Бічні ланцюги складаються з 1,2-залишків глюкози. Декстрини мають молекулярну масу 10^7 – 10^8 Дальтон, $[\alpha]^{25}_D$ – в межах від 208° до 233° . Властивості декстранів залежать від структури і молекулярної маси. Відомі декстрини, які розчиняються у воді, формаїді, диметилсульфоксиді (ДМСО), деякі розчинні тільки в лугах. Декстрини із заданими властивостями отримують за допомогою очищеної декстрасахарози. Макромолекули декстрану сильно розгалужені. На рис. 1.1 показана структурна формула макромолекули декстрану.

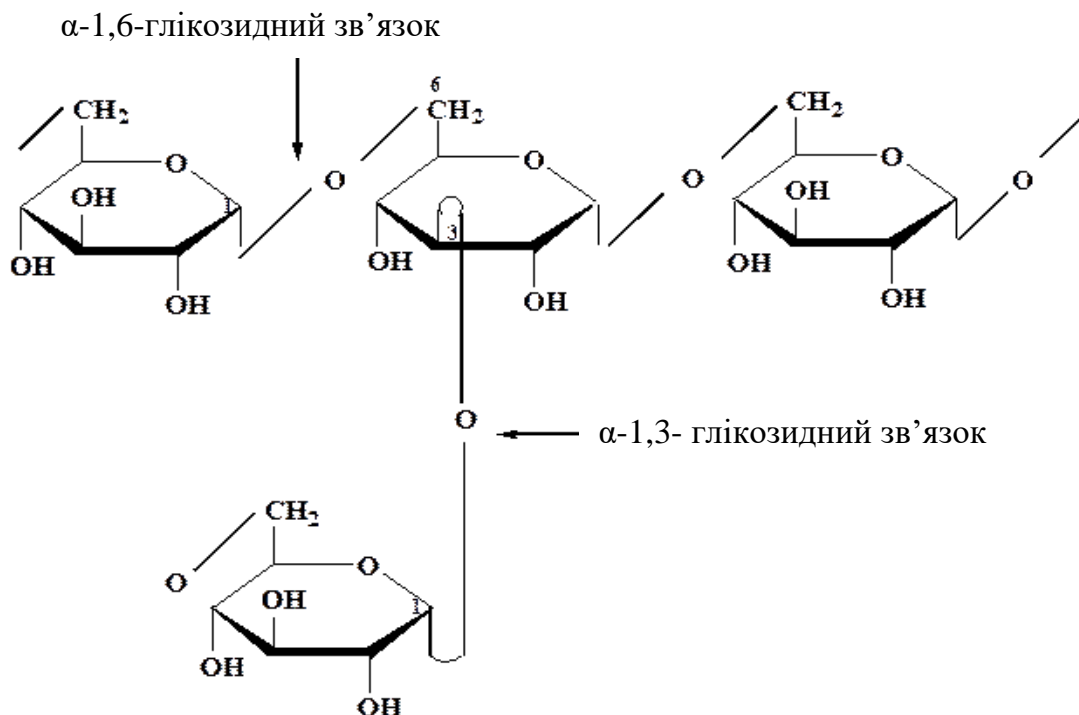


Рисунок 1.1. – Структурна формула макромолекули декстрана

Частково гідролізовані декстрини, так звані медичні, з молекулярною масою 30 000–80 000 Дальтон містять не менше 95 % 1,6-зв'язків. Декстрини забезпечують нормальний осмотичний тиск, який відповідає осмотичного тиску крові, а також їх використовують як плазмозамінники.

Показанням до застосування високомолекулярних декстранів є виражена постгеморагічна гіповолемія, обумовлена втратою плазми крові (опіки, синдром здавлення), втрати крові під час пологів, передопераційна та післяопераційна профілактика тромбоемболії.

Зшиті декстриани (сефадекси) використовуються як сорбенти для гел'єфільтрації, іонно-обмінної хроматографії і електрофорезу.



Завдання 1.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ ДЕКСТРАНІВ

Приготування мідно-тартратного розчину:

1) 3,46 г купрум (II) сульфату Р розчиняють у воді, доводять об'єм розчину водою до 50 мл.

2) 17,3 г калію-натрію тартрату Р і 5 г натрію гідроксиду Р розчиняють у 40 мл води. Нагрівають до кипіння, охолоджують, доводять об'єм отриманого розчину водою, вільної від двоокису вуглецю, до 50 мл.

Безпосередньо перед використанням змішують рівні об'єми розчинів (1) і (2).

Хід роботи

До 0,5 мл препарату переносять у пробірку, додають 0,1 мл кислоти хлористоводневої і упарюють на водяній бані до об'єму близько 0,1 мл. До отриманого залишку додають 3 мл розчину мідно-тартратного і витримують на водяній бані 30 секунд. Утворюється червоний або червоно-коричневий осад.



Завдання 2.

ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ДЕКСТРАНУ В РОЗЧИНІ

Визначення концентрації декстрану в розчині можна провести, використовуючи метод оптичного обертання. Для цього поляриметр повинен забезпечувати вимірювання з точністю до 0,01°. Шкалу зазвичай перевіряють за допомогою сертифікованих кварцевих пластинок. Лінійність шкали може бути перевірена за допомогою розчинів сахарози.

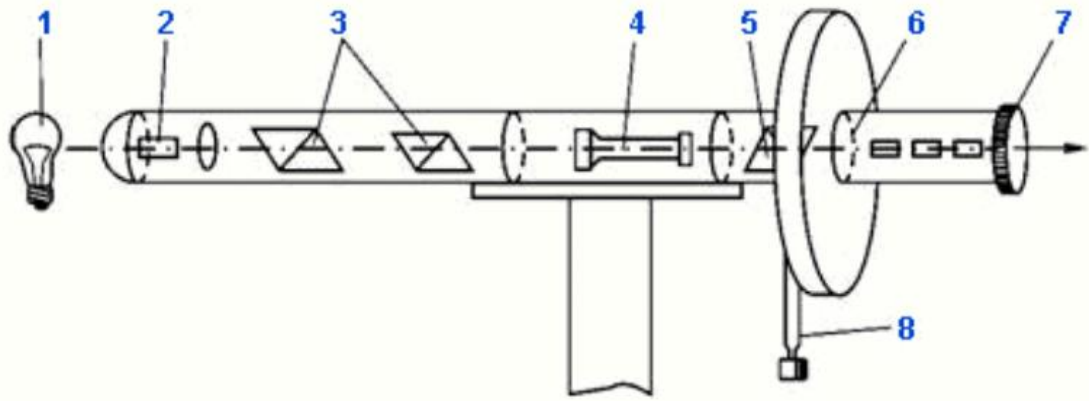


Рисунок 1.2 – Схема поляриметра: 1 – джерело світла; 2 – дихроматичний фільтр; 3 – поляризувальні призми Ніколя (поляризатор); 4 – кювети з розчином речовини; 5 – аналізувальна призма Ніколя (аналізатор); 6 – шкала; 7 – окуляр; 8 – рукоятка управління аналізатором.

Принцип роботи поляриметра такий: випущений джерелом – натрієвою лампою 1 – промінь розсіяного світла проходить через поляризатор 3 (призми Ніколя) і перетворюється на плоскополяризований. Цей промінь відрізняється від природного тим, що коливання векторів електромагнітного поля відбуваються в одній площині, названій площиною поляризації. На шляху поляризованого променя розміщують кювету з оптично активною речовиною 4, здатною обертати площину поляризації вліво чи вправо на певний кут. Для того щоб виміряти кут повороту α , вмонтована ще одна призма Ніколя – аналізатор 5. Шляхом обертання його вправо чи вліво домагаються повного гасіння прохідного променя світла. Кут, на який був при цьому повернутий аналізатор, і являє собою спостережуване оптичне обертання. Значення кута фіксують за шкалою 6.

Приготування розчинів:

1. 0,9 % розчин натрію хлориду. У воді очищеній розчиняють 0,9 г натрію хлориду і доводять об'єм розчину водою до 100 мл.

2. Розчин декстрану. У 0,9 % розчині натрію хлориду розчиняють 1,0 г декстрану 40 000, доводять об'єм розчину до 10 мл тим же розчинником. Замість розчину декстрану можна використовувати комерційний препарат «Рео-поліглюкін» (розчин для ін'єкцій).

Хід роботи

Питоме обертання розчину декстрану становить від $+195^\circ$ до $+201^\circ$ в перерахунку на суху речовину (10 % розчину препарату декстрану, товщина шару 1 дм).

Визначають нуль поляриметра і кут обертання площини поляризації при довжині хвилі лінії D спектра натрію ($\lambda = 589,3$ нм) при температурі $20 \pm 0,5$ °С. Визначають нуль приладу з закритою пробкою; проводять не менше п'яти вимірювань і розраховують середнє значення. Питоме оптичне обертання обчислюють за формулами, вказуючи праве і ліве обертання відповідно (+) і (-).

Для речовини в розчині:

$$[\alpha]_D^{20} = 1000 \cdot \alpha / C \cdot l,$$

де C – концентрація розчину, в г / л.

Вміст C обчислюють за формулою:

$$C = 1000 \cdot \alpha / l \cdot [\alpha]_D^{20},$$

де α – кут обертання, виміряний при температурі $20 \pm 0,5$ °С, в градусах;

l – довжина поляриметричної трубки, в дециметрах.



Завдання 3.

ВИЗНАЧЕННЯ В'ЯЗКОСТІ ТА ВІСКОЗИМЕТРИЧНОЇ СЕРЕДНЬОЇ МОЛЕКУЛЯРНОЇ МАСИ

В'язкість є мірою внутрішнього тертя рідин і характеризує опір їх течії при впливі зовнішніх напружень.

Коефіцієнт динамічної в'язкості (η) визначається тепловим рухом в системі, розміром і формою молекул і залежить від міжмолекулярних сил. Це визначає можливість використання методу віскозиметрії для визначення молекулярної маси лінійних полімерів, якими і є молекули бактеріальних декстранів.

Характеристична в'язкість ($[\eta]$) визначає гідродинамічний опір макромолекул потоку рідини в розчинах, в яких полімерні молекули знаходяться на таких великих відстанях одна від одної, що практично не взаємодіють. Для вимірювання в'язкості необхідна велике розбавлення розчину, що дозволяє ви-

ключити взаємодію між молекулами, зокрема, молекулами декстрану. Характеристична в'язкість не залежить від концентрації розчиненої речовини, але залежить від форми молекули і її молекулярної маси.

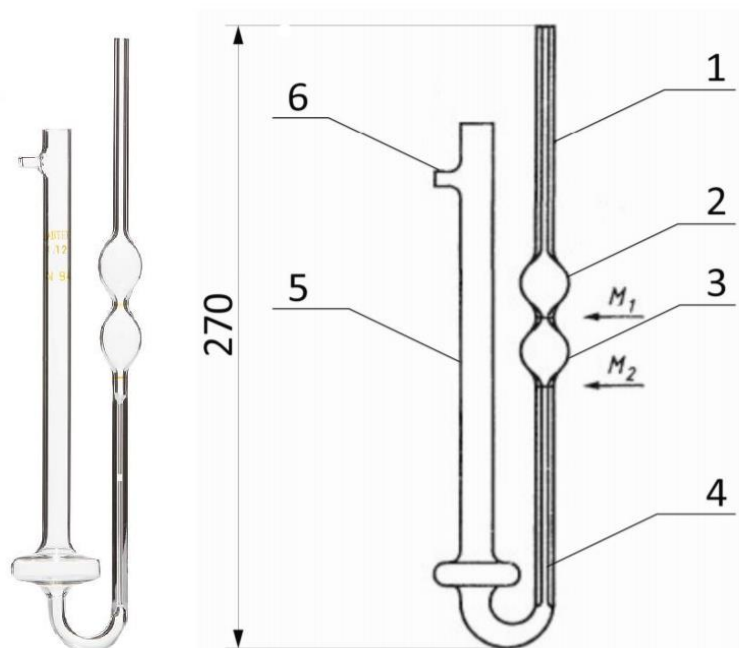


Рисунок 1.3 – Схема вискозиметра типу ВПЖ-4.

Для вимірювання на відвідну трубку 6 одягають резиновий шланг, далі затиснувши пальцем коліно 5 та перевернувши вискозиметр, опускають коліно 1 у ємність із рідиною та втягують її за допомогою резинової груші до мітки M_2 слідкуючи за тим, щоб у рідину не утворювались пухирці повітря. У той момент, коли рівень рідини досягне мітки M_2 резервуару 2, вискозиметр виймають із ємності та швидко перевертають у вихідне положення. Із зовнішньої сторони коліна 1 видаляють надлишок рідини та одягають на нього резинову трубку. Вискозиметр поміщають у термостат таким чином, щоб резервуар 2 був нижче рівня рідини у термостаті. Після витримування у термостаті не менше 15 хвилин при заданій температурі рідину засмоктують у коліно 1 приблизно до однієї третини висоти резервуару 2. Коліно 1 сполучають із атмосферою та визначають час проходження рідини від мітки M_1 до мітки M_2 .

Хід роботи

Для визначення в'язкості готують не менше п'яти досліджуваних розчинів різної концентрації.

Спочатку необхідно встановити температуру в термостаті $25 \pm 0,1$ °С. По-

тім поміщають у термостат віскозиметр і витримують 5–7 хвилин. Як контрольний розчин використовують 0,9 %-вий розчин натрію хлориду (розчинник декстрану). Віскозиметр заповнюють 0,9 %-вим розчином натрію хлориду і витримують протягом 10–15 хвилин для досягнення необхідної температури. При проходженні рівня рідини через верхню мітку віскозиметра включають секундомір, при проходженні рівня рідини через нижню мітку секундомір зупиняють.

У мірні колби місткістю 50 мл поміщають 5,0 мл (розчин 1), 7,5 мл (розчин 2), 10,0 мл (розчин 3), 12,5 мл (розчин 4) і 15,0 мл (розчин 5) 10 %-вий розчину препарату; доводять об'єм розчину до мітки водою; перемішують і фільтрують через скляний фільтр ПОР 16.

Визначають відносну в'язкість ($\eta_{\text{отн}}$) отриманих розчинів у віскозиметрі типу ВПЖ-4 з діаметром капіляра від 0,60 до 0,65 мм при температурі $25 \pm 0,1$ °С відносно 0,9 %-вого розчину натрію хлориду за формулою:

$$\eta_{\text{отн}} = \eta / \eta_0,$$

де η – в'язкість речовини;
 η_0 – в'язкість розчинника.

Величину *приведеної в'язкості* ($\eta_{\text{прив.}i}$) кожного з розчинів обчислюються за формулою:

$$\eta_{\text{прив.}i} = (\eta_{\text{відн.}i} - 1) / C_i,$$

де $\eta_{\text{відн.}i}$ – відносна в'язкість кожного досліджуваного розчину;
 C_i – концентрація, тобто вміст декстрану в 100 мл кожного досліджуваного розчину в грамах.

Величину характеристичної в'язкості $[\eta]$ обчислюють за формулою:

$$[\eta] = \frac{\sum_{i=1}^5 C_i^2 \sum_{i=1}^5 \eta_{\text{прив.}i} - \sum_{i=1}^5 C_i \sum_{i=1}^5 (C_i \cdot \eta_{\text{прив.}i})}{5 \sum_{i=1}^5 C_i^2 - \left(\sum_{i=1}^5 C_i \right)^2}.$$

Характеристична в'язкість препарату має бути в межах від 0,181 до 0,205.
Середню молекулярну масу препарату ($M_{\text{ср.}}$) обчислюють за формулою:

$$M_{\text{ср.}} = 10^{\left(\frac{2 \cdot \lg [\eta] \cdot 10^4}{9,66} \right)}$$

Середня молекулярна маса препарату має бути в межах від 35000 до 45000.

Всі одержані дані фіксують у таблиці результатів (протокол).

Таблиця 1.2 – Отримані дані

№ розчину	1	2	3	4	5
Вміст декстрану в 100 мл досліджуваного розчину, г					
Відносна в'язкість (1 визначення)					
Відносна в'язкість (2 визначення)					
Відносна в'язкість (3 визначення)					
Середня відносна в'язкість (із трьох визначень)					
Приведена в'язкість					
Характеристична в'язкість					
Середня молекулярна маса					



Контрольні запитання

1. Дайте характеристику бактеріальних декстранов.
2. Яке основне застосування декстранів?
3. Опишіть реакцію ідентифікації декстрану.
4. Дайте визначення поняттю «питоме оптичне обертання».
5. Опишіть принцип роботи з поляриметром.
6. Дайте визначення терміну «в'язкість розчину».
7. Дайте визначення кінематичної в'язкості.
8. За якою формулою розраховують величину приведеної в'язкості?
9. Як влаштований віскозиметр (типу «ВПЖ»)? Опишіть принцип його роботи.

Лабораторна робота 2. ОДЕРЖАННЯ ЕКСТРАКТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ АПАРАТУ СОКСЛЕТА

Мета роботи – ознайомитися із принципами одержання екстрактів із рослинної сировини; оволодіти методикою циркуляційної екстракції та методиками контролю екстракту.

Основні завдання:

1. Провести екстракцію куркуміну із кореневища куркуми довгої.
2. Визначити вміст сухої речовин у екстракті.
3. Провести ідентифікацію екстрагованих речовин.
4. Провести кількісне визначення куркуміну в екстракті.

Таблиця 2.1 – Перелік обладнання та матеріалів, необхідних для проведення лабораторної роботи

Номер завдання	Найменування обладнання та реактивів	1	2	3	4
Обладнання та матеріали	1. Апарат Сокслета із екстрактором на 200 мл	+			
	2. Ваги аналітичні	+	+		
	3. Колби мірні 25 мл				+
	4. Пробірки скляні				+
	5. Воронки конусні				+
	6. Бюкси скляні		+		
	7. Піпетки на 1,0 мл, 5,0 мл		+		+
	8. Циліндри мірні 50 мл, 100 мл	+		+	+
	9. Чашка порцелянова				+
	10. Водяна баня				+
	11. Плитка електрична або газова горілка				+
	12. Сушильна шафа (50–200 °С)		+		
	13. Фотоелектроколориметр				+
	14. Камера для висхідної хроматографії			+	
	15. Пластинки для хроматографії у тонкому шарі сигікагелю			+	
	16. Мікропіпетка або інсуліновий шприц			+	
Сировина	1. Кореневище куркуми довгої	+			

Закінчення таблиці 2.1

Номер завдання	Найменування обладнання та реактивів	1	2	3	4
Реактиви	1. Етанол, Р 2. Хлороформ, Р 3. Метанол, Р 4. Щавелева кислота, Р 5. Борна кислота, Р 6. Вода очищена, Р 7. Очищений зразок куркуміноідів	+		+	+



ТЕОРЕТИЧНА ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Настоянки – прозорі рідкі водно-спиртові витяги з висушеного або свіжого лікарської рослинної або тваринної сировини, які отримують без нагрівання і видалення екстрагента. Отримуючи настоянки з сухої рослинної сировини, що містить несильнодіючі речовини, дотримуються співвідношення вихідної сировини і готового продукту 1 : 5, а з сировини, що містить сильнодіючі речовини, – 1 : 10.

При цьому лікарську рослинну сировину беруть по масі, а настоянку отримують за об'ємом (з 1,0 кг сировини – 5 або 10 л відповідно). Виробництво настоянок складається з таких стадій:

- підготовка виробництва;
- підготовка вихідної сировини;
- отримання настойки;
- фасування, пакування та маркування настойки.

Підготовка виробництва включає підготовку повітря, приміщення, обладнання, персоналу, спецодягу відповідно класам чистоти С і D. Підготовка сировини включає подрібнення і просіювання лікарської рослинної сировини. Згідно з вимогами нормативних документів рослинна сировина перед екстрагуванням повинно мати певний розмір частинок, при цьому регламентується вміст великих частинок і пилу.

Необхідна кількість екстрагента визначається за формулою:

$$V = V_1 + PK ,$$

де V_1 – обсяг настойки (готового продукту), л або мл;

P – кількість рослинної сировини, кг або г;

K – коефіцієнт поглинання екстрагенту сировиною, яке зазвичай для трави і листя становить 2–3; для кори, коренів, кореневищ – 1,3–1,5.

Настоянки можуть бути простими, які отримуються з одного виду сировини і складними, що представляють суміш витяжок з декількох рослин, іноді з додаванням лікарських речовин. Для отримання настоянок частіше використовують висушений рослинний матеріал, в деяких випадках – свіжу сировину.

Рідкі екстракти – рідкі концентровані водно-спиртові витяжки. Як екстрагент при виробництві рідких екстрактів зазвичай застосовують 50–70 % етанол, рідше іншої концентрації.

Процес виробництва рідких екстрактів включає стадії:

- підготовка лікарської рослинної сировини та екстрагента;
- екстрагування лікарської рослинної сировини;
- очищення витяжки;
- стандартизація, фасування, пакування та маркування.

Підготовка сировини і екстрагента проводиться так само як, і при одержанні настоянок. Екстрагування лікарської рослинної сировини здійснюють методами дробної мацерації в різних модифікаціях, перколяції, різними видами реперколяції, протитечійним екстрагуванням.

Густі екстракти – концентровані витяжки з лікарської рослинної сировини, що представляють собою в'язкі маси з вмістом води не більше 25 %. Густі екстракти найчастіше застосовують як субстанції для виробництва готових лікарських форм (капсул, таблеток, супозиторіїв, сиропів, еліксирів, бальзамів, мазей та ін.).

Сухі екстракти – тверді лікарські форми або субстанції, одержувані шляхом екстракції лікарської рослинної (тваринної) сировини з подальшим видаленням екстрагента і містять не більше 5 % води.

Виробництво густих і сухих екстрактів включає такі стадії:

- підготовку лікарської рослинної сировини і екстрагента,
- екстрагування лікарської сировини,
- очищення витяжки,
- сушку згущеної витяжки;

➤ стандартизацію, фасовку, упакування, маркування.

Виробництво сухих екстрактів додатково включає стадію сушки витяжки, яка здійснюється або після згущення або замість неї, безпосередньо після стадії очищення.

Способи приготування екстрактів:

Раніше метод *мацерації*, або *настоювання* (від лат. *Maceratio* – вимочування) був поширений для отримання настоюнок. Сьогодні його застосування поступово скорочується, тому що цим методом важко досягти повноти виділення лікарських речовин з рослинного матеріалу.

Мацерація проводиться таким чином: подрібнену сировину з запропонованою кількістю екстрагенту завантажують в мацераційний бак і настоюють при температурі 15–20 °С, періодично перемішуючи. Якщо спеціально не обумовлені терміни, то настоювання проводять протягом 7 діб. Після настоювання витяжку зливають, залишок віджимають, віджату витяжку промивають невеликою кількістю екстрагента, знову віджимають, віджату витяжку додають до зливої спочатку, після чого об'єднану витяжку доводять екстрагентом до необхідного об'єму.

Даний метод – малоефективний, оскільки протікає повільно, а сировина повністю не виснажується. З метою інтенсифікації екстрагування матеріалу процес проводять з використанням дробної мацерації (ремацерації), мацерації з примусовою циркуляцією екстрагента, вихрової екстракції (турбоекстракції), ультразвуку та ін.

Ремацерація, або **дробна мацерація** з розподілом на частини екстрагента або сировини і екстрагента. При цьому загальна кількість екстрагента ділиться на 3–4 частини і послідовно настоюють сировину з першою частиною екстрагента, потім з другою, третьою і четвертою кожен раз зливаючи витяжку. Час настоювання залежить від властивостей рослинного матеріалу. Таке проведення процесу екстрагування дозволяє при менших витратах часу повніше виснажити сировину, оскільки постійно підтримується висока різниця концентрацій у сировині та екстрагенті.

Мацерація з примусовою циркуляцією екстрагента. Проводиться в мацераційному баку з перфорованим дном на яке укладають фільтруючий матеріал. Екстрагент, відокремлений від сировини перфорованим дном, за допомогою насоса прокачується через сировину до досягнення рівноважної концентрації. При цьому час настоювання скорочується у кілька разів. З примусовою цирку-

ляцією екстрагента проводять також дробну мацерацію. У цьому випадку досягається більш повне виснаження сировини при тій же витраті екстрагента.

Вихрова екстракція, або **турбоекстракція** заснована на вихровому, дуже інтенсивному перемішуванні сировини і екстрагента при одночасному подрібненні сировини. Турбінна мішалка обертається зі швидкістю 8000–13000 об./хв. Час екстракції скорочується до 10 хв.

Ультразвукова екстракція. Для інтенсифікації мацераційного процесу ефективно застосовування ультразвукових коливань. При цьому прискорюється екстрагування і досягається повнота екстракції діючих речовин. Джерело ультразвуку поміщають в середовище, що обробляється, або кріплять до корпусу мацераційного бака в місці, заповненому екстрагентом і сировиною. Виникаючі ультразвукові хвилі створюють закономірний тиск, кавітацію і «звуковий вітер». В результаті прискорюється просочення матеріалу і розчинення вмісту клітини, збільшується швидкість обтікання частинок сировини, у пограничному дифузійному шарі екстрагента виникають турбулентні і вихрові потоки. Молекулярна дифузія усередині клітин матеріалу і в дифузійному шарі змінюється на конвективну, що приводить до інтенсифікації масообміну. Виникнення кавітації викликає руйнування клітин. При цьому екстрагування прискорюється за рахунок вимивання екстрактивних речовин із зруйнованих клітин і тканин. При озвучуванні витяжку можна отримати протягом декількох хвилин.

До інших видів динамізації мацерації належать: розмелювання сировини в середовищі екстрагента, наприклад, в кульової млині; ремацерація, що супроводжується пресуванням на гідравлічних пресах або вальцях. В останньому випадку процес повторюється до досягнення рівноважних концентрацій. Метод дозволяє скоротити втрати діючих речовин і екстрагента, оскільки в шроті залишається невеликий об'єм витяжки. У готової настоянки міститься висока кількість екстрактивних речовин.

Перколяція (від лат. *Percolatio* – "проціджування через"), тобто проціджування екстрагента через рослинний матеріал з метою виділення розчинених в екстрагенті речовин. Процес проводиться в ємностях різної конструкції, які називаються перколяторами-екстракторами. Вони можуть бути циліндричної або конічної форми (рис. 2.1), з паровою сорочкою або без неї, перекидні і саморозвантаженням, виготовлені з нержавіючої сталі, алюмінію, лудженої міді та інших матеріалів. У нижній частині перколятора є «хибне» дно (перфорована сітка) (1), на якому розміщують фільтруючий матеріал (2) (мішкочина, полотно та ін.) і завантажують сировину. Циліндричні перколятори зручні в роботі при

вивантаженні сировини, конічні – забезпечують більш рівномірне екстрагування.

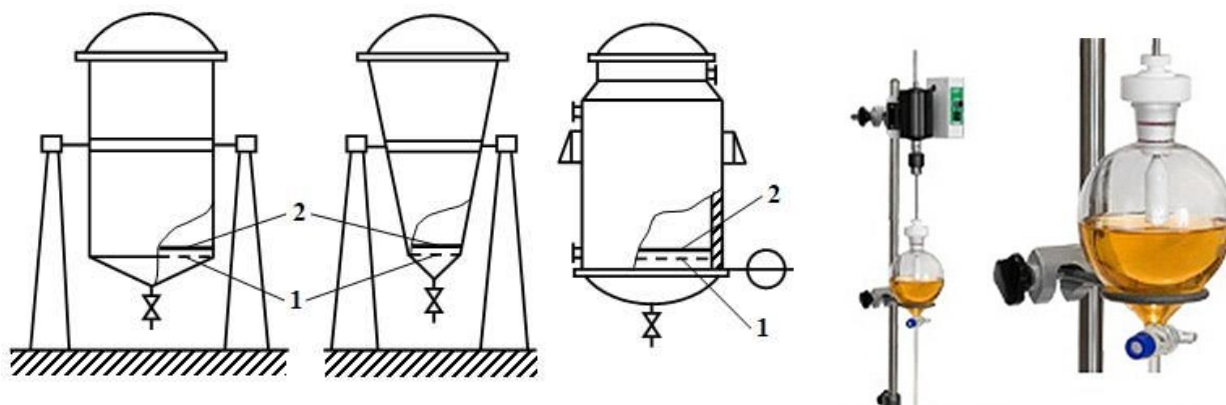


Рисунок 2.1 – Перколятори-екстрактори

Метод перколяції включає три послідовно протікають стадії: намочування сировини (набухання сировини), настоювання, власне перколяції.

Намочування (набухання) проводиться поза перколятором. Найчастіше для цього використовують мацераційні баки або інші ємності, з яких зручно вивантажувати замочену сировину. Для намочування використовують від 50 до 100 % екстрагенту відносно маси сировини. Після перемішування сировину залишають на 4–5 годин у закритій ємності. За цей час екстрагент проникає між частинками рослинного матеріалу і всередину клітин, сировина набухає, збільшуючись в об'ємі. При цьому відбувається розчинення діючих речовин усередині клітини. У виробничих умовах замочування може бути поєднане з настоюванням, але якщо сировина здатна до сильного набухання, то стадію намочування обов'язково проводять в окремій ємності, оскільки внаслідок великого збільшення об'єму матеріалу в перколяторі воно може сильно спресуватися і взагалі не пропускати екстрагент.

Настоювання – друга стадія процесу перколяції. Матеріал після набухання або сухий завантажують у перколятор на перфороване дно з оптимальною щільністю, щоб у сировині залишалася якнайменше повітря. Зверху накривають фільтрувальним матеріалом, притискають перфорованим диском і заливають екстрагентом таким чином, щоб максимально витиснути повітря. Можна проводити завантаження матеріалу в мішок з фільтруючого матеріалу, що заповнює весь об'єм перколятора. У верхній частині мішок зав'язують і кладуть груз. Сировину заливають екстрагентом до утворення «дзеркала», висота шару

якого над сировиною повинна бути близько 30–40 мм, і проводять настоювання 24–48 годин, доки не буде досягнута рівноважна концентрація. Для багатьох видів сировини час настоювання може бути скорочено.

Власне перколяція – безперервне проходження екстрагента через шар сировини та збір перколята. При цьому злив перколята і одночасна подача зверху екстрагента проводиться зі швидкістю що не перевищує 1/24 або 1/48 (для великих виробництв) частини використовованого обсягу перколятора за 1 годину. При цьому насичена витяжка витісняється з рослинного матеріалу струмом свіжого екстрагента і створюється різниця концентрацій речовин, що екстрагуються в сировині і екстрагент. Швидкість перколяції повинна бути такою, щоб встигала відбутися дифузія екстрагованих речовин у витяжку. При приготуванні настоянок перколяцію закінчують одержанням п'яти або десяти об'ємів (в залежності від властивостей сировини) витяжки по відношенню до маси взятої сировини.

При отриманні витяжки методом перколяції розрахунок необхідної кількості екстрагента проводять за формулою:

$$V = n \cdot V + P \cdot K,$$

де n – число об'ємів екстрагенту, необхідного для повного виснаження сировини (зазвичай потрібно від 5 до 10 об'ємів екстрагенту і залежить від властивостей сировини);

V – об'єм рідкого екстракту (готового продукту);

P – кількість рослинної сировини, кг або г;

K – коефіцієнт поглинання екстрагенту сировиною (для трави і листя становить 2–3, для кори і коренів – 1,3–1,5). Зазначені величини (K) є середніми, тому що навіть для одного і того ж виду сировини даний коефіцієнт може варіювати в широких межах (іноді різниться в кілька разів!) в залежності від концентрації екстрагенту, ступеня і способу подрібнення сировини.

При одержанні настоянок у промисловості з метою максимальної інтенсифікації екстрагування в процес перколяції вносять зміни. Часто замість типової перколяції використовують настоювання, циркуляцію та їх поєднання.

В одному з варіантів перколяції першу досить концентровану витяжку зливають окремо, цілком спускаючи її з перколятора. Потім перколятор заповнюють свіжим екстрагентом, який після настоювання протягом 3–6 годин зли-

вають повністю. Отриману другу витяжку об'єднують із першою, а із сировиною проводять ще 1–2 подібні операції, поки не зберуть необхідну кількість витяжки.

В іншому випадку в процесі настоювання проводять циркуляцію екстрагента в перколяторі-екстракторі за допомогою насоса, який подає витяжку з нижньої частини у верхню. Така циркуляція екстрагента проводиться до рівноважної концентрації. При цьому час настоювання набагато скорочується. Далі проводять перколяцію шляхом витіснення чистим екстрагентом.

Отримані вилучення є каламутними рідинами, що містять значну кількість зважених частинок. Очищення витяжок проводять відстоюванням при температурі не вище 10 °С до одержання прозорої рідини. При цій температурі зменшується розчинність екстрагованих речовин і тому надалі, в процесі зберігання настоек при температурі 15 °С, ймовірність появи осаду невелика. Після відстоювання протягом не менше 2 діб проводять фільтрування декантацією і фільтрують від включень, що потрапили випадково. Для фільтрації застосовують фільтр-преси, друк-фільтри, центрифуги. Нутч-фільтри використовувати не рекомендується через можливу втрату екстрагента.

У даній лабораторній роботі пропонується одержання екстракту куркуміну із кореневища куркуми довгої (*Curcuma Longa L.*).

Curcuma Longa L. (рис. 2.2) належить до відділу *Magnoliophyta* (Покритонасінні), класу *Liliopsida* (Однодольні), порядку *Zingiberales* (Імбирноцвітні), сімейству *Zingiberaceae* (Імбирні). За хімічним складом кореневище куркуми довгої містить 69,4 % вуглеводів, 6,3 % білків, 5,1 % жирів, 3,5 % мінералів, 13,1 % вологи. На сьогоднішній день у складі куркуми довгої ідентифіковано більше 200 сполук, в основному фенольні сполуки, терпеноїди та ефірні олії. Основним джерелом біологічно активних сполук є кореневище, яке містить до 4,5 % куркуміну (але не менше 1,0 %), 5 % ефірних олій, 4 % рослинних олій, 4 % смол, 5,1 % волокон, 10,1 % білків, 52 % крохмалю.

Curcuma Longa L. як лікарська рослина здавна використовується у східній медицині. На сьогоднішній день ця рослина описана у Державні Фармакопеї України, Європейській Фармакопеї, а також документах Міністерства охорони здоров'я Канади та FDA.



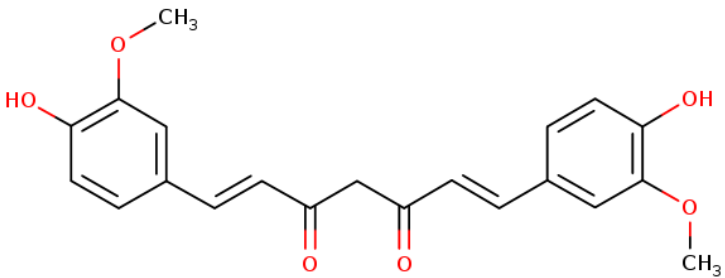
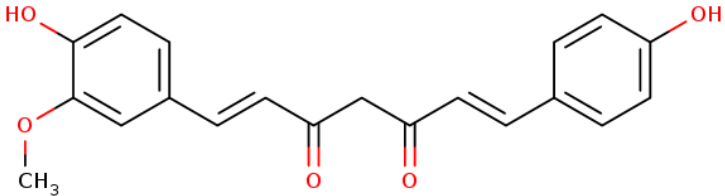
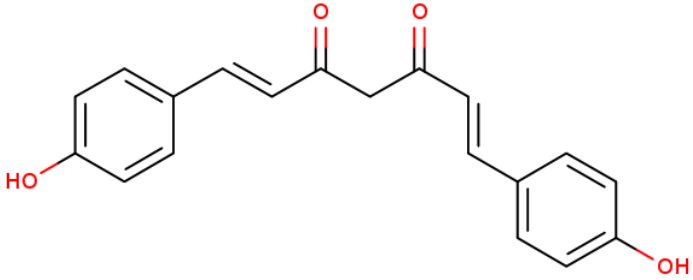
Рисунок 2.2 – Куркума довга: зліва – зображення рослини, справа – кореневище куркуми.

Куркумін – основний поліфенольний компонент куркуми, виділений із кореневища *Curcuma longa* L., який має яскраво виражений жовтий колір. куркумін визнано безпечним до застосування як харчової добавки ВООЗ. FDA визнано безпечним використання куркуміну, виділеного із кореневища *Curcuma Longa* L., у складі харчових лікувальних продуктів у дозі 1000 мг/день. У Фармакопеї США 2020 представлено монографії на куркумін у формі капсул та таблеток.

Під «куркуміном» розуміють суміш трьох куркуміноїдів (табл. 2.2.)

Куркумін є гідрофобною сполукою, не розчиняється у воді та ефірі, розчиняється у крижаній оцтовій кислоті, етилацетаті, метанолі та тетрагідрофурані; слабо розчиняється в ацетоні, бензолі та сірковуглеці.

Таблиця 2.2 – Хімічна структура куркуміноїдів

<p><i>Диферулометан (власне куркумін або куркумін-I)</i> – основний куркуміноїд, на частку якого приходиться 70–75 %.</p>	<p>Загальна формула – $C_{21}H_{20}O_6$. Молекулярна маса – 368,41. Хімічна назва – 1,7-біс(4-гідрокси-3-метоксифеніл)-1,6-гептадієн-3,5-діон. Температура плавлення – 183 °С.</p>
	<p><i>Деметоксикуркумін (куркумін II, DMC)</i> – куркуміноїд, на частку якого приходиться 10–20 %.</p>
	<p><i>Бісдеметоксикуркумін (куркумін-III, BDMC)</i> – куркуміноїд, на частку якого приходиться до 10 %.</p>
	<p>Загальна формула – $C_{19}H_{16}O_4$. Молекулярна маса – 308,33. Хімічна назва – 1,7-біс (4-гідроксифеніл) гепта-1,6-дієн-3,5-діон. Температура плавлення – 227–229 °С.</p>

Протягом останніх років підтверджена протизапальна, протипухлинна, гепатопротекторна, нейропротекторна, ранозагоювальна, антибактеріальна, антикоагулянтна та ін. фармакологічна активність куркуміну.

Ряд досліджень спрямовані на вивчення куркуміну як протипухлинного агенту, оскільки він приймає участь у регуляції ряду молекулярних механізмів, що відіграють важливу роль у процесі канцерогенезу: стимуляція апоптозу, ін-

гібування факторів росту онкологічних клітин (наприклад, NF-κB) і прозапальних цитокінів, зв'язування активних форм кисню і зменшення запалення. Куркумін індукує апоптоз ракових клітин шляхом регулювання сигнальних шляхів і зупинки циклу розвитку пухлинних клітин.

При цьому куркумін має низьку токсичність і добре переноситься навіть у високих дозах. Вивчення безпеки куркумін показало, що його прийом в дозі 8 г/добу протягом 3 місяців не спричиняв будь-якого токсичного ефекту на організм людини.

При введенні *per os* виявлено терапевтичний ефект куркуміну у хворих на діабет, серцево-судинні і аутоімунні захворювання. Куркумін призводив до зменшення тривалості симптомів при лікуванні остеоартриту і ревматоїдного артрити. Використання куркуміну у терапії цукрового діабету показало збільшення чутливості до інсуліну, регенерації β-клітин острівців Лангерганса, стимуляції секреції інсуліну і С-пептиду, активації глікогенезу в печінці, нормалізації ліпідного обміну, а також зниження інтенсивності всмоктування вуглеводів в травному тракті.

Показана гепатопротекторна ефективність куркуміну у клініці безалкогольної жирової хвороби – протягом 8 тижнів прийому *per os* дисперсійного препарату куркуміну в дозі 70 мг відбувалося значне зниження вмісту жиру в печінці (78,9 % проти 27,5 % в групі плацебо), зменшення індексу маси тіла і покращення біохімічних показників крові. На моделі пошкодження печінки щурів введенням CCl₄ показано, що застосування куркуміну *per os* в дозах 200 і 400 мг/кг знижує активність амінотрансфераз і лужної фосфатази, покращує гістологічну структуру печінки, зменшує оксидативний стрес і рівень запальних цитокінів.

Перспективним напрямком є застосування куркуміну як нейропротектору, зокрема при хворобі Паркінсона, Альцгеймера та інсульті. Показано, що куркумін може частково запобігати появі нових бляшок і значно зменшити існуючі відкладення β-амілоїду. Прийом куркуміну дозволяв прискорити відновлення пацієнтів, що перенесли інсульт. Показана ефективність куркуміну у запобіганні агрегації α-синуклеїну, шляхом утворення комплексу та сприяючи його виведенню.

Науковцями кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії НТУ «ХП» розроблено технологію одержання екстракту куркуміну та його очистки.

Схема одержання екстракту куркуміну наведена на рис. 2.3.

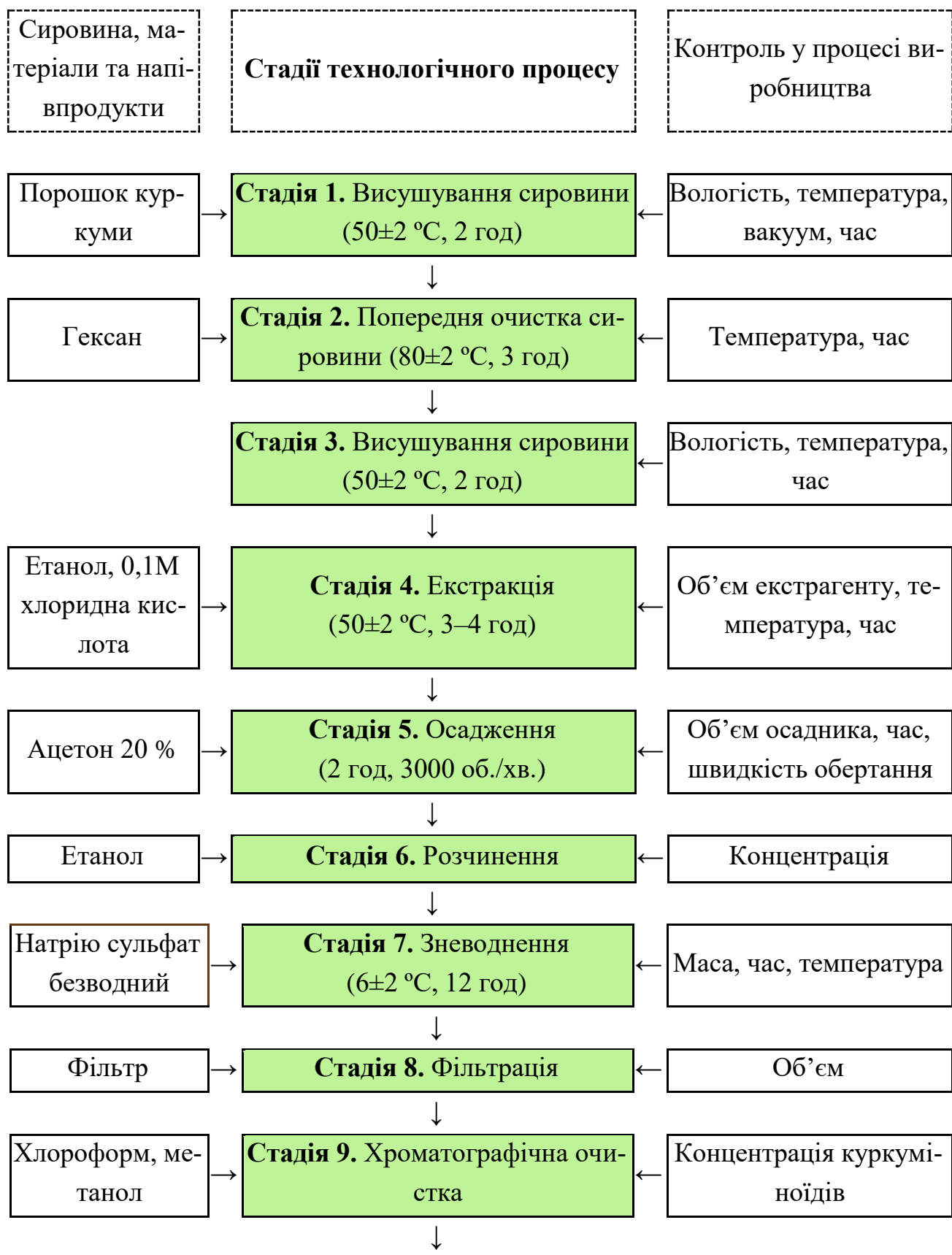


Рисунок 2.3 – Схема одержання екстракту куркуміну

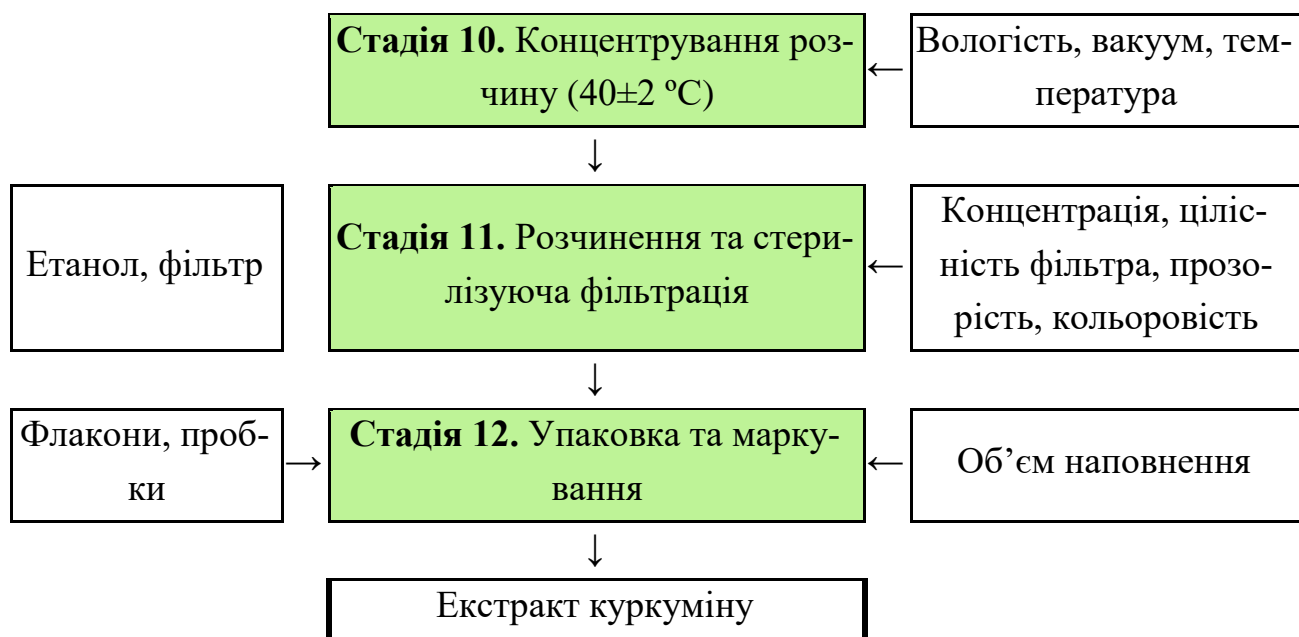


Рисунок 2.3 – Схема одержання екстракту куркуміну (продовження)

Стадія 1. Порошок куркуми зважують та висушують при 50 ± 2 °C у вакуумі до постійної маси протягом 2 годин.

Стадія 2. Висушений порошок куркуми поміщають у гільзи апарату Сокслета, у колбу додають гексан із розрахунку сировина : гексан – 1 : 5 та проводять екстракцію баластних речовин до повного знебарвлення розчинника.

Стадія 3. Порошок висушують при температурі 50 ± 2 °C для видалення залишку гексану протягом 2 годин.

Стадія 4. Висушений порошок куркуми поміщають у скляну колбу, додають екстрагент (96 % етанол з додаванням 1 % 0,1 М розчину хлоридної кислоти) із розрахунку сировина : екстрагент – 1 : 5 та проводять екстракцію при температурі 50 ± 2 °C протягом 3–4 годин при періодичному перемішуванні. Після чого екстракт охолоджують до кімнатної температури та фільтрують через шар фільтрувального паперу.

Стадія 5. Готують осадник – суміш ацетон : вода в об'ємному співвідношенні 1 : 4. Екстракт куркуміну змішують із осадником в об'ємному співвідношенні 1 : 2 та центрифугують 2 години при 3000 об./хв. Супернатант зливають, а осад куркуміну розчиняють у мінімальній кількості 96 % етанолу.

Стадії 6–8. Осад куркуміну розчиняють у 96 % етанолі. Для видалення води до розчину куркуміну додають попередньо прокалений при температурі 180–200 °C протягом 2 годин сульфат натрію у кількості 20 г на 100 мл розчину

та витримували при 6 ± 2 °C протягом 12 годин. Осад солі відділяють фільтруванням, фільтрат направляють на хроматографічну очистку.

Стадія 9. Розчин куркуміну наносять на хроматографічну колонку, заповнену силікагелем та елюють, контролюючи отримані фракції на вміст та співвідношення куркуміноїдів методом ТШХ, таким чином: рухома фаза – хлороформ : метанол (97:3) – десорбція диферулометану і диметоксикуркуміну; хлороформ : метанол (95:5) – десорбція диметоксикуркуміну і бісдиметоксикуркуміну; хлороформ : метанол (90:10) – десорбція домішок. Колоночна хроматографія дає можливість розділення сумішей рідких або твердих речовин, що ґрунтується на різній спорідненості цих речовин до нерухомої (сорбент) і рухомої (елюент) фази. Чим краще речовина сорбується нерухомою фазою, тим повільніше речовина виходить з колонки. даних полярність куркуміноїдів збільшується у ряду диферулометан – диметоксикуркумін – бісдиметоксикуркумін, тож збільшення концентрації полярного розчинника – метанолу у рухомій фазі збільшує десорбцію куркуміноїдів

Стадія 10. Хлороформ-метанольний розчин поміщають у колбу ротаційного випарювача та видаляють розчинник при температурі 40 ± 2 °C.

Стадія 11. Колбу випарника зважують та суху плівку куркуміну розчиняють у етанолі до концентрації 10 ± 1 мг/мл. Етанол був обраний у якості розчинника у готовому екстракті, оскільки він використовується при подальшому отриманні ліпідної плівки із куркуміном. Етанольний розчин фільтрують через гідрофобний фільтр із розміром пор $0,22$ мкм.

Стадія 12. Екстракт куркуміну розливають у флакони із темного скла, об'ємом 100 мл, закривають пробками і зберігають при температурі 4–8 °C 12 місяців у флаконах темного скла, оскільки куркумін є світлочутливим.



Завдання 1.

ЕКСТРАКЦІЯ КУРКУМІНУ ІЗ КОРЕНЕВИЩА КУРКУМИ ДОВГОЇ

Метод безперервної екстракції дозволяє отримати найбільш повне виділення активних компонентів з рослинної сировини. У лабораторних умовах безперервну екстракцію в системах «тверда фаза-рідина» виконують у апараті Сокслета.

Апарат Сокслета складається з трьох головних частин (рис. 2.4): плоскодонної або круглodonної колби, екстрактора (насадка Сокслета), зворотного хо-

лодильника. У колбу наливають розчинник для екстракції. З'єднують колбу з екстрактором, в який поміщають рослинну сировину (в паперовому патроні або мішечку з тканини). Екстрактор з'єднують зі зворотним холодильником. Екстрактор (насадка Сокслета) являє собою скляну посудину певної форми, який забезпечений двома трубками – паропровідною і трубкою-сифоном для зливу рідини з екстрактора у колбу з розчинником.

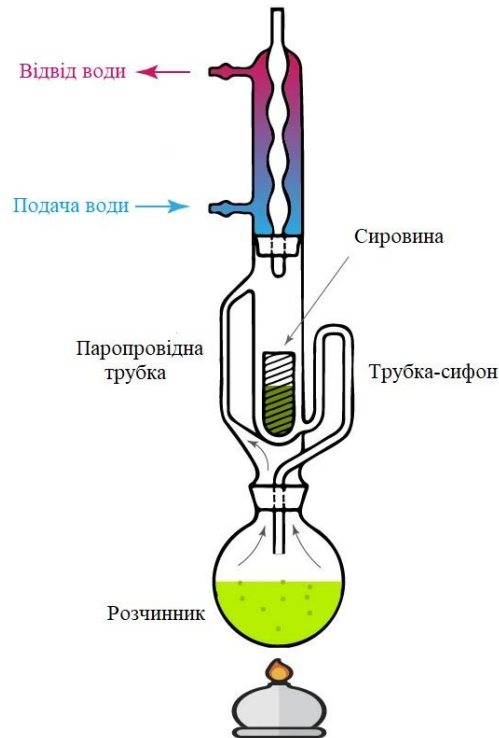


Рисунок 2.4 – Схематичне зображення апарату Сокслета

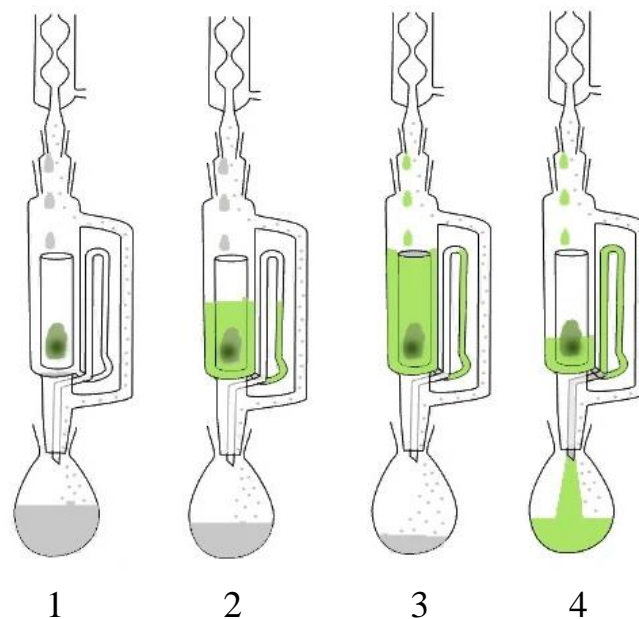


Рисунок 2.5 – Принцип дії апарату Сокслета:

1) при нагріванні розчинника в колбі його пари піднімаються по паропровідній трубці екстрактора, минаючи рослинну сировину, і потрапляють у зворотній холодильник, де пари конденсуються;

2) конденсат пари розчинника стікає в екстрактор з рослинною сировиною, відбувається вилучення в розчинник активних компонентів сировини. Утворюється екстракт – розчин витягнутих речовин в розчиннику;

3) коли рівень рідини в екстракторі досягне висоти трубки-сифона, надлишок рідини екстракту через сифон буде зливатися в колбу з розчинником і витягнуті з сировини речовини стануть збиратися і накопичуватися в колбі з розчинником;

4) розчинник безперервно випаровується, тому в екстрактор безперервно надходить чистий розчинник, який виконує екстракцію. При гарній роботі зворотного холодильника об'єм розчинника в апараті Сокслета змінюється мало, навіть при досить тривалій дії приладу. Тому невелика кількість розчинника дозволяє виконати екстракцію ефективно.

Хід роботи

1. У круглодонну колбу об'ємом 400–500 мл наливають 100 мл екстрагенту (етанол) і поміщають 2–3 центри кипіння («кипільки»), поміщають колбу на водяну баню і закріплюють її лапкою в штативі.

2. В отвір колби поміщають екстрактор Сокслета і також закріплюють його за допомогою лапки.

3. Поміщають в екстрактор гільзу або фільтр-пакет з подрібненим і висушеним кореневищем куркуми довгої.

4. Заливають у екстрактор Сокслета 250 мл екстрагенту для прискорення процесу екстракції.

5. Приєднують шланги до зворотного холодильника і крану для подачі води.

6. Вставляють холодильник в отвір екстрактора Сокслета, та також закріплюють холодильник лапкою.

7. Подають воду в холодильник.

8. Вмикають плитку або газову горілку та проводять екстракцію до практично повного знебарвлення екстрагенту у екстракторі. Зверніть увагу на те, що розчинник не має



Завдання 2.

ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ СУХОЇ РЕЧОВИН У ЕКСТРАКТИ

Визначення сухого залишку екстракту проводять відповідно до вимог ДФУ 2.8.16.

Хід роботи

2.00 мл екстракту помішають у зважений бюкс або плоскодонну чашку. Випарюють насухо на водяній бані та сушать у сушильній шафі при температурі 100–105 °С протягом 3 год. Охолоджують в ексікаторі і зважують. Результат виражають у вагових відсотках або у грамах на літр.



Завдання 3.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЕКСТРАГОВАНИХ РЕЧОВИН

Приготування розчинів:

1. *Хроматографічна система (А) розчинників для дослідження куркуміна.* У скляну колбу місткістю 250 мл з притертою скляною пробкою додають 98 мл хлороформу і 2 мл метанолу, перемішують, щільно закривають пробкою. Система повинна бути прозорою.

2. *Стандартний розчин куркуміноїдів.* 250 мг очищеного зразку куркуміноїдів (наприклад, одержаний за схемою 2.3) або стандартного зразку куркуміноїдів (наприклад, виробництва фірми Sigma) помістити у мірну колбу об'ємом 25 мл, розчинити у мінімальному об'ємі етанолу та довести до мітки тим же розчинником.

Хроматографію в тонкому шарі силікагелю проводять відповідно до вимог ДФУ 2.2.27.

Хід роботи

Визначення проводиться методом хроматографії в тонкому шарі силікагелю: 0,05 мл екстракту за допомогою (мікропіпетки або інсулінового шприца) наносять у вигляді смужки довжиною 5–7 мм і шириною 1–2 мм на лінію старту пластинки розміром 120 x 90 мм із закріпленим шаром силікагелю. Аналогічно наносять 0,05 мл 1 %-вого стандартного розчину куркуміноїдів.

Пластину з нанесеною пробою висушують на повітрі протягом 5–6 хвилин, після чого поміщають в камеру висотою 190–220 мм, діаметром 150–200 мм, яка містить хроматографічну систему Б і хроматографують висхідним методом. Коли фронт розчинника дійде до краю пластини, її виймають з камери, висушують на повітрі протягом 15–20 хвилин. На хроматограмі досліджуваного зразка мають виявлятися три плями жовтого кольору на рівні плям стандартного розчину куркуміноїдів: куркуміну (R_f 0,4), диметоксикуркуміну (R_f 0,16), бісдиметоксикуркуміну (R_f 0,08).

Примітки:

1) За відсутності комерційних пластин для тонкошарової хроматографії («Silufol», «Merck» та ін.) можливе приготування пластин за такою методикою: у ступці ретельно перемішують 3,2 г силікагелю і 7,5 мл води до отримання однорідної маси, яку наносять рівним шаром на пластинку. Пластинку висушують на горизонтальній поверхні протягом 3-х годин при температурі 20 ± 2 °С, а потім активують у сушильній шафі при температурі 110 ± 5 °С протягом 40–50 хвилин.

2) Камеру для проведення хроматографії готують за 40–50 хвилин до нанесення ліпідних зразків.



Завдання 4.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КУРКУМІНУ В ЕКСТРАКТІ

Концентрацію куркуміну в ліпосомах визначають колориметрично після утворення кольорового комплексу з борною кислотою в присутності щавлевої кислоти при довжині хвилі 540 нм.

Приготування розчинів:

1. 80 %-вий етанол. У бутель об'ємом 1 л додають 833 мл спирту етилового 96,0 % та 167 мл води дистильованої, перемішують.

2. Реактив: по 1 г щавлевої та борної кислоти поміщають у мірну колбу об'ємом 100 мл, доводять до мітки 80 % етанолом, перемішують.

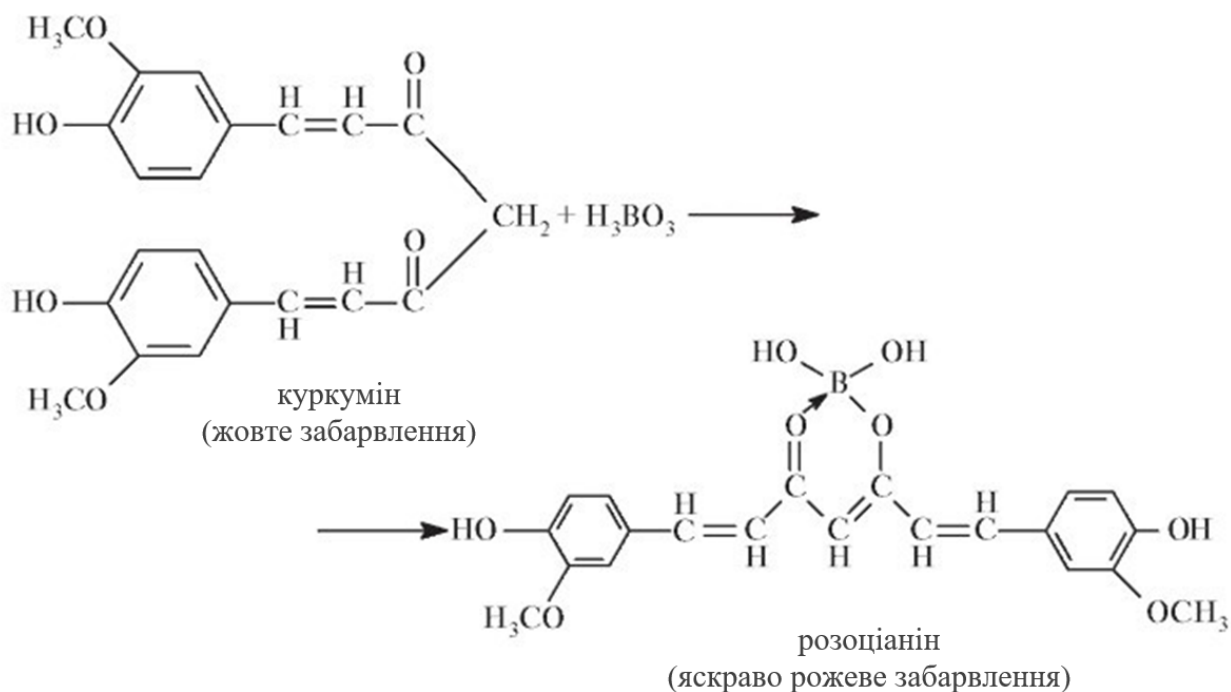


Рисунок 2.3 – Схема реакції куркуміну із борною кислотою

Хід роботи

Розчин А: 1 мл випробуваного розчину поміщають у мірну колбу об'ємом 25 мл, доводять до мітки 80 % етанолом.

Розчин Б: 2 мл розчину А і 1 мл реактиву поміщають у порцелянову чашку і випарюють до сухого залишку на водяній бані при 50–60 °С. Утворюється комплекс яскраво малинового кольору. Залишок кількісно змивають у мірну колбу об'ємом 25 мл і доводять до мітки 80 % етанолом.

Розчин В: 2 мл розчину А поміщають у мірну колбу об'ємом 25 мл, доводять до мітки 80 % етанолом.

За потреби розчини Б і В додатково розводять. Вимірюють оптичну густину розчину Б у порівнянні із розчином В при довжині хвилі 540 нм у кюветі шириною 1 см. Концентрацію куркуміну у випробуваному розчині (мг/мл) розраховують за формулою:

$$C_{cur} = \frac{A \cdot C_{ет.} \cdot k_{розв.}}{A_{ет.}},$$

де A – оптична густина розчину Б;

$A_{ет.}$ – питомий показник світлопоглинання кольорового комплексу 1 % розчину куркуміну у кюветі 1 см, рівний 2050;

$C_{ет.}$ – концентрація еталону, рівна 10 мг/мл;

$k_{розб.}$ – коефіцієнт розбавлення.

Визначають вміст куркуміну в екстракті у відсотках за формулою:

$$W = \frac{C_{Cur}}{m_{сух.зал.}} \cdot 100 \%,$$

де C_{Cur} – концентрація куркуміну в екстракті, мг/мл;

$m_{сух.зал.}$ – маса сухого залишку екстракту, мг/мл.



Контрольні запитання

1. Дайте визначення екстракції.
2. Які види екстракції вам відомі? Назвіть її переваги та недоліки.
3. Назвіть переваги та недоліки безперервної екстракції.
4. Опишіть принцип дії апарату Сокслета.
5. Опишіть методику визначення сухого залишку екстракту.
6. Опишіть основні методичні підходи до проведення хроматографії в тонкому шарі силікагелю.
7. Опишіть методику кількісного визначення куркуміну в екстракті.

Лабораторна робота 3. МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ФОРМ ТА ЇХ КОНТРОЛЬ

Мета роботи – ознайомитися із методами отримання моноламельярних ліпосом, ліпосом із включенням в мембрану активного фармацевтичного інгредієнту, наприклад, молекули поліфенольних сполук (куркуміну), визначення включеного в ліпосомі активного фармацевтичного інгредієнту.

Основні завдання:

1. Ознайомитися із загальними принципами і підходами до одержання ліпосом. Одержання ліпосом методом гідратації ліпідної плівки із наступною гомогенізацією шляхом екструзії, з включенням до складу ліпідного бішару поліфенольних сполук.
2. Визначити фракційний складу отриманої ліпосомальної форми з інкапсульованою поліфенольною сполукою методом хроматографії в тонкому шарі силікагелю.
3. Визначити концентрацію фосфатидилхоліну.
4. Визначити кількість інкапсульованого активного фармацевтичного інгредієнту (куркуміну).

Таблиця 3.1 – Перелік обладнання та матеріалів, необхідних для проведення лабораторної роботи

Номер завдання	Найменування обладнання та реактивів	1	2	3	4
Обладнання та матеріали	1. Ваги аналітичні	+	+		+
	2. Лабораторний екструдер «Avanti Polar Lipids»	+			
	3. Набір фільтрів для екструдера	+			
	4. Шафа сушильна 100–200 °С			+	
	5. Водяна баня				+
	6. Плитка електрична			+	+
	7. Фотоелектроколориметр	+		+	+
	8. Вакуумний насос	+			
	9. рН-метр	+		+	
	10. Колби з притертою кришкою 250 мл		+		
	11. Колби мірні 25, 100, 500, 1000 мл		+	+	+

Закінчення таблиці 3.1

Номер Завдання	Найменування обладнання та реактивів	1	2	3	4
	12. Колба круглодонна 50 мл	+			
	13. Піпетки 1 мл, 5 мл, 10 мл	+		+	+
	14. Циліндри мірні 50, 100 мл			+	+
	15. Воронки конусні			+	+
	16. Пробірки скляні термостійкі			+	
	17. Камера для висхідної хроматографії		+		
	18. Пластинки для хроматографії у тонкому шарі		+		
	19. Мікропіпетка або інсуліновий шприц		+		
Сировина	1. Фосфатидилхолін яєчного жовтку	+			
	2. Куркуміну екстракт	+			
Реактиви	8. Етанол, Р	+			+
	9. Хлороформ, иР		+		
	10. Метанол, Р		+		
	11. Щавелева кислота, Р				+
	12. Борна кислота, Р				+
	13. Йод кристалічний, Р		+		
	14. Сірчана кислота, Р			+	
	15. Хлоратна кислота, Р			+	
	16. Азотна кислота, Р			+	
	17. Аміаку розчин концентрований, Р1			+	
	18. Амонію ванадат, Р			+	
	19. Амонію молібдат, Р			+	
	20. Калію дигідрофосфат, Р	+		+	
	21. Динатрію фосфат дигідрат, Р			+	
	22. Магнію сульфат, Р	+			
	23. Вода очищена, Р		+	+	+
	24. Стандартний зразок фосфатидилхоліну		+	+	
	25. Стандартний зразок куркуміноїдів		+	+	



ТЕОРЕТИЧНА ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Ліпосомами називають штучні частинки, утворені одним або кількома концентричними замкнутими ліпідними бішарами, що відмежовують внутрішню водну фазу від зовнішнього середовища.

При диспергуванні у воді багато фосфоліпідів можуть мимовільно утворювати гетерогену суміш везикул, що складаються з делькох концентричних бішарових мембран. Ці структури називають мультиламелярними ліпосомами. Сьогодні відомі малі моноламелярні ліпосоми з діаметром 20–50 нм і великі моноламелярні ліпосоми діаметром 50–450 нм.

Нанорозмірні ліпосоми на сьогоднішній день широко використовуються у нанотехнологіях. Ліпосоми з великими розмірами також можуть бути використані в медичних цілях. Дослідження нових типів ліпосом здійснюється в різних напрямках. Ліпосоми традиційно використовуються як модельний об'єкт, що імітує клітинну мембрану. При цьому об'єктом дослідження може бути не тільки ліпідний компонент мембрани, але й білок-ліпідні взаємодії, якщо в мембрану вбудовані білкові компоненти. Крім того ліпосоми можуть служити для доставки різних компонентів у живу клітину. У ліпосоми можуть бути вбудовані різні активні фармацевтичні інгредієнти (АФІ), причому, як ліпофільні, так і гідрофільні. Також ліпосоми можуть використовуватися для доставки генетичного матеріалу.

В даний час ліпосомальні лікарські препарати широко представлені на фармацевтичному ринку для лікування, діагностики і профілактики ряду захворювань. Інтерес до ліпосом як нанобіотехнологічних систем доставки лікарських засобів продиктований такими їх *перевагами*:

- ліпосоми підвищують біодоступність інкапсульованих у них АФІ, підвищуючи їх фармакологічну ефективність та дозволяючи зменшити ефективну дозу АФІ;
- ліпосоми пролонгують дію АФІ;
- ліпосоми дозволяють перевести ліпофільні АФІ у водорозчинну форму для парентерального введення;
- ліпосоми захищають АФІ від деградації ферментами та макрофагами організму;
- ліпосоми зменшують токсичний вплив АФІ на організм;
- ліпосоми повністю біодеградують в організмі людини.

Активно використовуються ліпосомальні препарати в онкології, вакцинології, пульмонології, офтальмології та інших напрямках медицини. На сьогоднішній день на фармацевтичному ринку наявні близько 50-ти ліпосомальних форм препаратів різної направленості [141–143], серед яких:

➤ *протигрибкові* – ліпосомальна форма амфотерицину В («Abelcet», виробництва Liposome Company, США; «Ambisom», виробництва NeXstar Pharmaceuticals, США; «Amphotec», виробництва Liposome Technology, США; «Ampholip», виробництва Bharat serum, Індія);

➤ *протиухлинні* – ліпосомальна форма доксорубіцину («Doxil», виробництва Alza Pharmaceuticals, США; «DauneHome», виробництва NeXstar Pharmaceuticals, США; «CueLux», виробництва Schering-Plough, Бельгія; «Myocet», Elan Pharma, США; «Ліподокс», виробництва Фармстандарт-Біолік, Україна); ліпосомальна форма вінкристину («Marqibo», виробництва Talon Therapeutics, США); ліпосомальна форма іринотекану («Onivyde (MM-398)», виробництва Merrimack Pharmaceuticals, США);

➤ *ліпосомальні вакцини* – проти грипу («Lipovaca Influenza», виробництва Vaccine, Болгарія; «Invivac virosomal Influenza vaccine», виробництва Solvay, Бельгія); проти гепатиту В («НераХен», виробництва Лірохен, Велика Британія);

➤ *антибактеріальні* – ліпосомальна форма амікацину («Arikace», виробництва Insmmed Incorporated, Китай); ліпосомальна форма тобраміцину («Fluidosomes», виробництва Axentis Pharma, Швейцарія);

➤ *офтальмологічні* – ліпосомальна форма Quer («Ліподокс», виробництва Фармстандарт-Біолік, Україна); ліпосомальна форма вертепорфірину («Vysudin», виробництва Novartis Pharma, Швейцарія) та ін.

Отримання мультиламелярних ліпосом та включення АФІ проводять одним із таких методів:

Метод ліпідної плівки передбачає отримання розчину фосфоліпідів у відповідному органічному розчиннику з наступним випарюванням розчинника у вакуумі до отримання тонкої сухої плівки ліпідів. Після чого плівку ресуспендують у водному буферному середовищі. Метод ліпідної плівки дозволяє отримувати ліпосоми як з гідрофобними, так і з гідрофільними АФІ. При цьому гідрофобні АФІ розчиняють у органічному розчиннику і змішують із розчином фосфоліпідів, після чого отримують ліпідну плівку, що містить АФІ, а гідрофільні АФІ розчиняють у водній фазі, яку використовують для ресуспендування плівки. Для запобігання процесам окислення ліпідів отриману емульсію наси-

чують азотом або інертним газом. Цей метод забезпечує високу ефективність інкапсуляції гідрофобних АФІ (до 90 %), тоді як для гідрофільних АФІ ступінь інкапсуляції становить 30–50 %. З метою підвищення ступеня інкапсуляції гідрофільних АФІ використовують метод хімічного градієнту або метод хімічного зв'язування з компонентами бішару.

Метод хімічного градієнта іонів передбачає отримання ліпідної плівки з наступним ресуспендуванням буферним розчином, який містить компоненти, які реагують з АФІ шляхом обміну іонів або комплексоутворення. Після отримання ліпосом зовнішній буфер замінюють на нейтральний. При додаванні АФІ, він переходить у внутрішній простір ліпосом шляхом дифузії і, зв'язуючись із компонентами всередині ліпосоми, втрачає здатність дифундувати назовні.

Метод хімічного зв'язку ґрунтується на утворенні хімічного зв'язку між компонентом бішару ліпосом та АФІ. Такий підхід ефективний, наприклад, при включенні заряджених АФІ за допомогою їх зв'язування із протилежно зарядженим фосфоліпідом.

Метод випарювання в оберненій фазі передбачає УЗ-обробку суміші буферної водної фази із водорозчинними АФІ, які необхідно включити в ліпосоми, та органічної фази із фосфоліпідами. При цьому утворюються обернені міцели – дрібні краплі води, які стабілізуються фосфоліпідним моношаром та диспергуються у надлишку органічного розчинника. Повільне видалення органічного розчинника у вакуумі призводить до переходу обернених міцел у зв'язку гелеподібну структуру. У критичній точці цієї стадії гель руйнується та деякі з міцел розпадаються, а із надлишку фосфоліпідів формується бішар навколо міцел, які залишилися, що і приводить до утворення ліпосом. Основним недоліком цього методу є те, що органічний розчинник може призводити до часткової або повної деградації АФІ, наприклад, білка.

Метод видалення детергенту передбачає отримання розчину фосфоліпідів, АФІ та детергенту, після чого детергент (наприклад, холат, дезоксихолат натрію та ін.) та неінкапсульовані АФІ видаляють одним із підхожих методів, наприклад, діафільтрацією, що приводить до утворення гомогенних за розміром ліпосом. Завдяки м'яким умовам проведення цей метод дозволяє запобігти денатурації білкових АФІ. Недоліком є низька стабільність ліпосом.

Метод інжекції передбачає вприскування у водну фазу розчину фосфоліпідів у легкому органічному розчиннику. На розмір утворених ліпосом впливають зміною температурного режиму, інтенсивності перемішування, роз-

чинника та концентрації фосфоліпідів. Недоліком даного методу є низький ступінь інкапсуляції АФІ у ліпосомі, необхідність видалення органічного розчинника, нестандартність складу та низька стабільність ліпосом.

Отримання моноламелярних ліпосом із мультиламелярних здійснюють одним із таких методів:

Метод спонтанної везикуляції заснований на мимовільному формуванні ліпосом при швидкому збільшенні рН водних дисперсій фосфоліпідів. Недоліками методу є: обмеженість фосфоліпідного складу; висока швидкість процесу, що ускладнює його використання для отримання промислових об'ємів ліпосом; нестабільність багатьох АФІ при значенні рН більше 9,0.

УЗ-обробка – процес отримання ліпосом за допомогою ультразвуку. До недоліків цього методу відносять низьку продуктивність, підвищення індексу окислення і гідроліз фосфоліпідів, тривалість технологічного процесу, підвищення температури реакційної суміші, неоднорідність складу ліпосом, необхідність додаткової стабілізації ліпосом, чутливість ряду АФІ до ультразвуку.

Метод екструзії ґрунтується на подрібненні везикул при припусканні через спеціальний клапан під високим тиском. Процес здійснюється у гомогенізаторах високого тиску при температурі вище температури фазового переходу ліпідів ліпосомальної мембрани. Сьогодні у фармацевтичній промисловості для отримання ліпосомальних форм найчастіше використовують саме метод екструзії. Перевагами цього методу є висока продуктивність, мінімальне окиснення та гідроліз фосфоліпідів, стандартність складу ліпосом, автоматизованість процесу, робота в умовах асептики, можливість контролю температури та тиску.

У даній лабораторній роботі будуть розглянуті ліпосомі з інкапсульованою в них поліфенольною природною сполукою – куркуміном. Куркумін має виражену протипухлинну, антиоксидантну, протизапальну, кардіопротекторну та інші види фармакологічної активності, але основним недоліком, що перешкоджає широкому застосуванню куркуміну в медичній практиці є вкрай низька біодоступність при прийомі *per os*, неможливість його проникнення в тканини мозку через гематоенцефалічний бар'єр і неефективність прийому таблеток. Необхідність створення ін'єкційного препарату куркуміну стала поштовхом до створення його нанобіотехнологічної форми.

Доставка ліків при включенні їх до складу наночастинок є ефективним підходом до покращення фармакокінетичних властивостей, розчинності та стабільності та, як наслідок, збільшення біодоступності лікарських засобів. Цей підхід успішно показав себе у доклінічних дослідженнях куркуміну. Інкапсуля-

ція куркуміну в наночастинки на основі полімерів, ліпідів, міцели, ліпосом, гідрогелів та ін. дає можливість отримати ін'єкційний препарат.

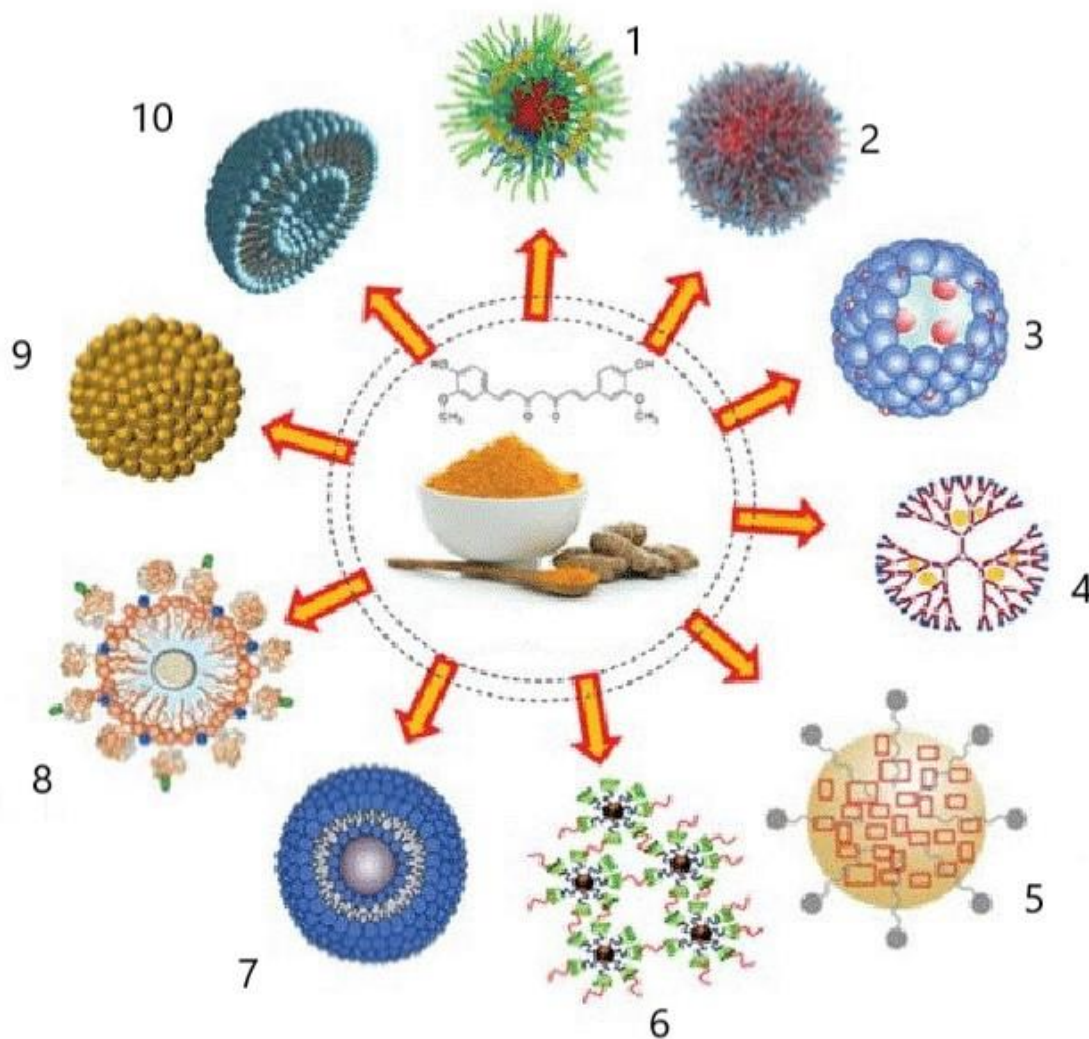


Рисунок 3.1 – Відомі системи доставки ліків з нанокуркуміном: 1) полімерні міцели; 2) полімерні наночастинки; 3) наногель; 4) дендримери; 5) наноемульсії; 6) комплекс включення; 7) фітосоми; 8) тверді ліпідні наночастинки; 9) наночастинки куркуміна; 10) ліпосоми.

Інкапсуляція куркуміну в ліпосоми дозволяє отримати стабільну емульсійну форму. Ліпосоми забезпечують ефективну систему доставки ліків, можуть посилювати протипухлинну і фармакологічну активність куркуміну шляхом покращення фармакокінетики та фармакодинаміки, дозволяють зменшити ефективну дозу. Виражені протизапальні та антиоксидантні властивості ліпосомальної форми куркуміну, отриманої на основі яєчного фосфатидилхоліну, продемонстровані на моделі ішемії нирок, зменшуючи наслідки ішемії, знижу-

ючи рівень сироваткової сечовини і креатиніну, знижуючи показники оксидативного і нітрозативного стресу. Протизапальний ефект також проявлявся у зниженні експресії NF-κB в тубулярних епітеліальних клітинах нирок і антиген-презентуючих клітинах, зниженні експресії прозапальних цитокінів.

Введення ліпосомальної форми куркуміну на основі фосфатидилхоліну та холестерину назально щурам з хворобою Альцгеймера призводило до пригнічення активності прозапальних цитокінів, ангіотензин-перетворюючого ферменту у відділах головного мозку і сироватці крові, відновлення пам'яті (умовна реакція уникнення).

У порівнянні з вільним куркуміном, застосування ліпосомального куркуміна покращує фармакокінетику і фармакодинаміку. Показано збільшення протипухлинної активності ліпосомального куркуміну у порівнянні з його вільною формою, що проявлялось у підвищенні синтезу цитокінів, пригніченні росту пухлинних клітин і зменшенні ангіогенезу, а також індукції апоптозу. Ліпосомальний куркумін пригнічує ріст клітин меланоми, раку підшлункової залози і раку молочної залози, проявляє цитостатичний ефект на рівні з оксаліплатином (відомим протипухлинним засобом) як *in vitro*, так і *in vivo* при колоректальному раку.

Куркумін включають в комплексні ліпосоми з різними АФІ, такими як вітамін А, фолієва кислота, гіалуронова кислота, циклодекстрини, діоксид кремнію і кон'югати ПЕГ. На думку ряду вчених, поєднання куркуміну з іншим АФІ у ліпосомальній формі може бути ідеальною стратегією в клінічній практиці для лікування раку та інших патологій.

Застосування комплексу ліпосомального куркуміну із γ-циклодекстрином дозволило підвищити протипухлинну активність при остеосаркомі. Куркумін у комбінації з паклітакселом у ліпосомальній формі значно інгібували ріст клітин MCF-7 в порівнянні з використанням кожного з них окремо. Комплексна терапія куркуміном і расвератролом у ліпосомальній формі ефективно пригнічувала ріст пухлинних клітин та призводила до активації процесу апоптозу *in vitro* та *in vivo*.

Науковцями кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії НТУ «ХП» розроблено технологію одержання ліпосомальної форми куркуміну. Технологічна схема представлена на рис. 3.2.

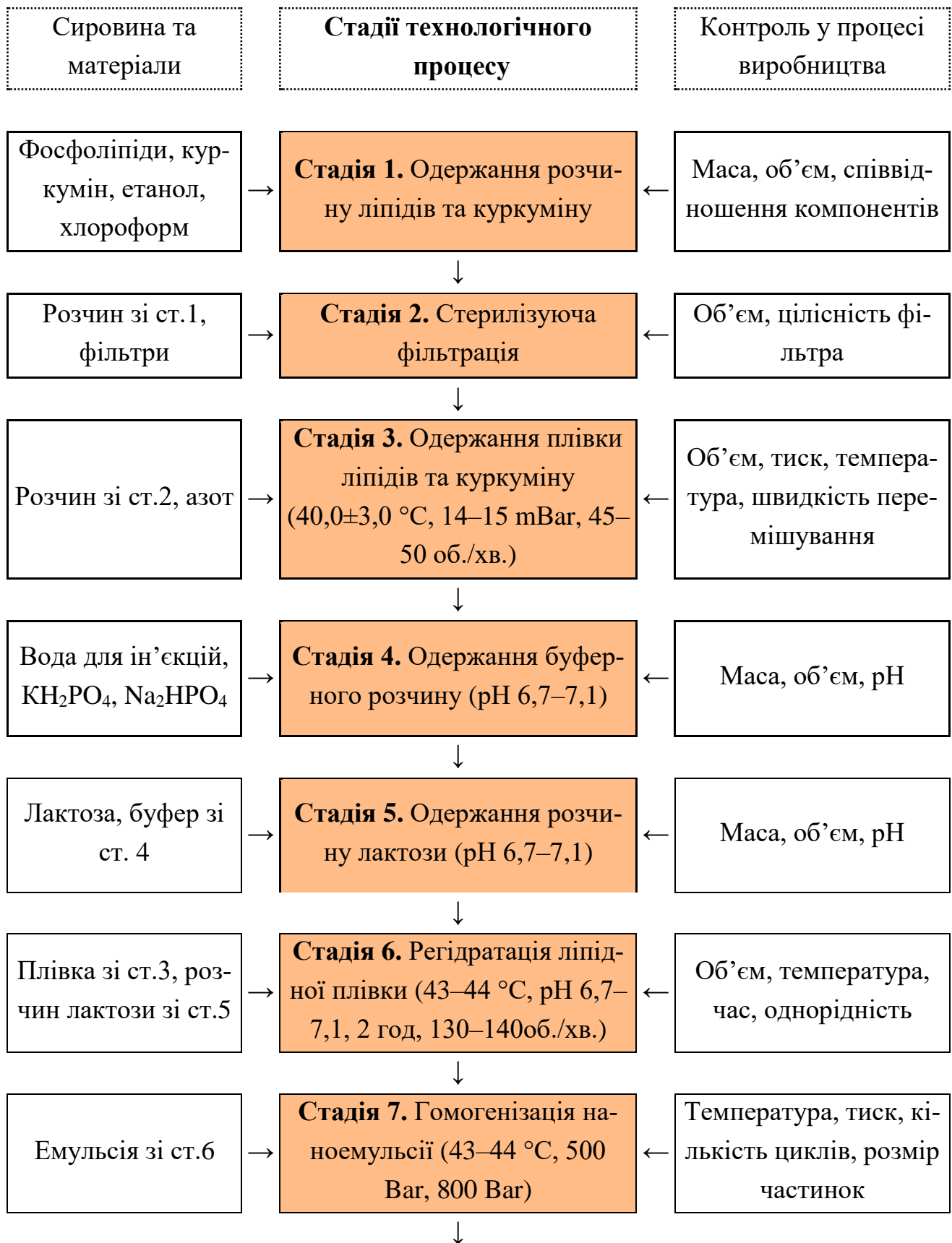


Рисунок 3.2 – Схема одержання ліпосомальної форми куркуміну

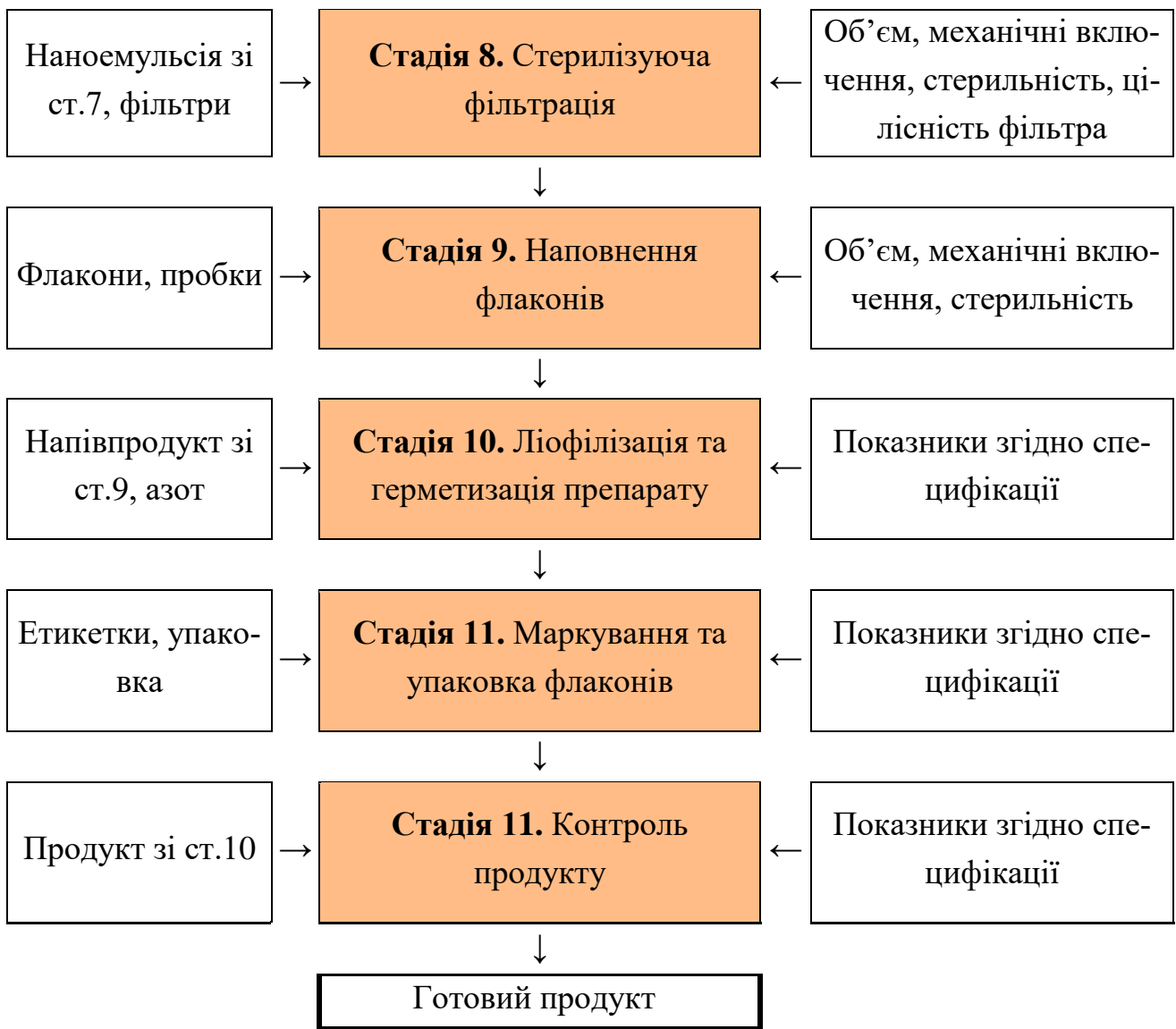


Рисунок 3.2 – Схема одержання ліпосомальної форми куркуміну (продовження)



Завдання 1.

ОЗНАЙОМЛЕННЯ ІЗ ЗАГАЛЬНИМИ ПРИНЦИПАМИ І ПІДХОДАМИ ДО ОДЕРЖАННЯ ЛІПОСОМ. ОДЕРЖАННЯ ЛІПОСОМ МЕТОДОМ ГІДРАТАЦІЇ ЛІПІДНОЇ ПЛІВКИ ІЗ НАСТУПНОЮ ГОМОГЕНІЗАЦІЄЮ ШЛЯХОМ ЕКСТРУЗІЇ, З ВКЛЮЧЕННЯМ ДО СКЛАДУ ЛІПІДНОГО БІШАРУ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК

Приготування розчинів:

1. *Буферний розчин А.* В 100 мл дистильованої води розчиняють 0,685 г KH_2PO_4 і 0,024 г MgSO_4 , доводять рН до значення 7,5 сухим гідроксидом калію. Буфер зберігають при температурі +4 С протягом 1–2 місяців.

2. Розчин фосфатидилхоліну. 20,0 мг яєчного фосфатидилхоліну розчиняють у мінімальній кількості етанолу (розчин Б).

3. Розчин куркуміну. 0,5 мг куркуміна розчиняють у мінімальній кількості етанолу або відбирають етанольний екстракт куркуміну у кількості, що відповідає 0,5 мг куркуміну (розчин В).

4. Розчин фосфатидилхоліну (Б) та куркуміну (В) об'єднують і перемішують (розчин Г)

Хід роботи

1. Стадія отримання плівки ліпиду та куркуміну. Розчин Г переносять у круглодонну колбу, яку поміщають на водяну баню при температурі 37–42 °С. Підключають вакуумний насос і концентрують розчин до утворення сухої плівки. На цій стадії температура і величина вакууму, які забезпечують швидку концентрацію розчинених компонентів, є критичними факторами. Концентрування проводять до повної відсутності органічних розчинників.

2. Утворення багатошарових везикул. До отриманої плівки додають буферний розчин А в кількості 10 мл і перемішують до повного зняття плівки з поверхні скляної колби.

3. Отримання ліпосом. У даній роботі проводять гомогенізацію емульсії за допомогою екструдера LiposoFast-Basic виробництва AVESTIN, Inc. and AVESTIN Europe, GmbH. Принцип отримання ліпосом методом екструзії полягає в тому, що при продавлюванні суспензії багатошарових ліпосом через полікарбонатні фільтри з порами певного діаметра вони розбиваються на частинки із розміром, відповідним розмірам пор фільтра.

Екструдер збирають за схемою представленою на рис. 3.3, поміщаючи всередину фільтр із максимальним розміром пор (наприклад, 1000 нм). Після того як екструдер зібрано отриману емульсію багатошарових везикул набирають в один із шприців екструдера. Два мікрошприця обережно вставляють в отвори з двох сторін екструдера. Натискаючи на поршень заповненого суспензією ліпосом шприца продавлюють суспензію ліпосом через мембрану. Потім продавлюють суспензію ліпосом в іншу сторону, натискаючи на поршень другого шприца. Операцію через фільтр проводять проводять мінімум 3–4 рази, після чого фільтр замінюють на фільтр із меншим розміром пор (наприклад, 400 нм) і повторюють операцію. Оптичну густину емульсії вимірюють після кожного фільтру при $\lambda=540$ нм. Із кожним циклом екструзії оптична густина

емульсії має зменшуватись, отримані ліпосоми повинні мати розмір, що відповідає розмірам пор фільтрів (наприклад, 1000, 400 або 100 нм).

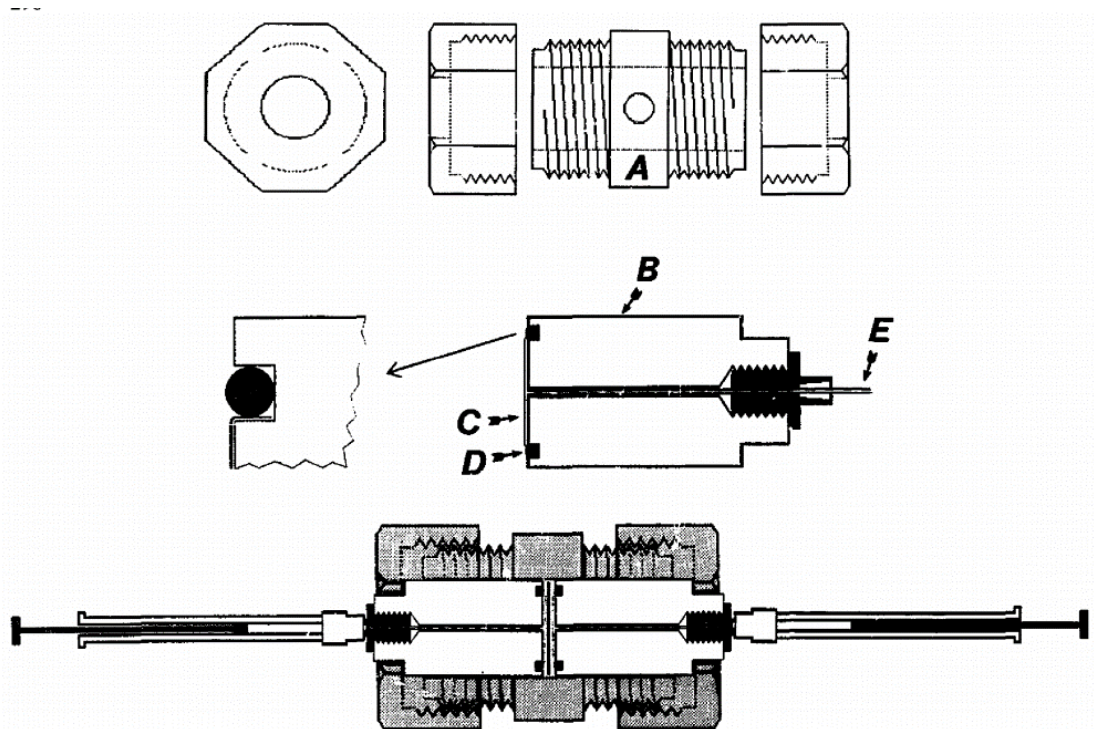


Рисунок 3.3 – Схема екструдера LiposoFast-Basic: А – корпус з двома торцевими ковпачками, які забезпечують надійне кріплення мембранних опор В (2 шт.); С – нейлонова поверхня, що забезпечує розподіл суспензії по фільтру; D – O-подібне гумове кільце (2 шт.), що забезпечує герметичність фільтру; E – отвір для введення/виведення суспензії за допомогою мікрошприця (2 шт.).



Рисунок 3.4 – Екструдер у зібраному вигляді

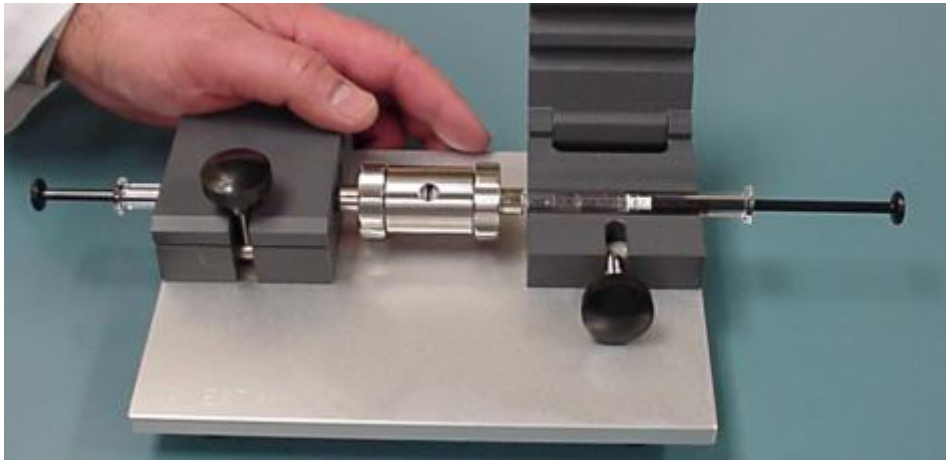


Рисунок 3.5 – Екструдер у фіксаторі



Завдання 2.

ВИЗНАЧЕННЯ ФРАКЦІЙНОГО СКЛАДУ ОТРИМАНОЇ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ФОРМИ З ІНКАПСУЛЬОВАНОЮ ПОЛІФЕНОЛЬНОЮ СПЛУКОЮ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФІЇ В ТОНКОМУ ШАРІ СИЛІКАГЕЛЮ

Приготування розчинів:

1. *Хроматографічна система (А) розчинників для дослідження куркуміна.* У скляну колбу місткістю 250 мл з притертою скляною пробкою додають 98 мл хлороформу і 2 мл метанолу, перемішують, щільно закривають пробкою. Система повинна бути прозорою.

2. *Хроматографічна система (Б) розчинників для дослідження фосфоліпідів.* У скляну колбу місткістю 250 мл з притертою скляною пробкою додають 65 мл хлороформу, 25 мл метанолу та 4 мл води (65: 25: 4), перемішують, щільно закривають пробкою. Система повинна бути прозорою.

3. *Досліджуваний розчин:* 0,5 мл отриманої ліпосомальної емульсії поміщають у скляний стакан об'ємом 50 мл і додають 9,5 мл метанолу, перемішують.

4. *Стандартний розчин фосфатидилхоліну.* 250 мг стандартного зразку фосфатидиліну (наприклад, виробництва фірми Sigma) помістити у мірну колбу об'ємом 25 мл, розчинити у мінімальному об'ємі етанолу та довести до мітки тим же розчинником.

5. *Стандартний розчин куркуміноїдів.* Стандартний розчин куркуміноїдів. 250 мг очищеного зразку куркуміноїдів (наприклад, одержаний за схемою

2.3) або стандартного зразку куркуміноїдів (наприклад, виробництва фірми Sigma) помістити у мірну колбу об'ємом 25 мл, розчинити у мінімальному об'ємі етанолу та довести до мітки тим же розчинником.

Хроматографію в тонкому шарі силікагелю проводять відповідно до вимог ДФУ 2.2.27.

Хід роботи

1. Визначення складу фосфоліпідів отриманої ліпосомальної форми.

Визначення проводиться методом хроматографії в тонкому шарі силікагелю: 0,05 мл досліджуваного розчину за допомогою (мікропіпетки або інсулінового шприца) наносять у вигляді смужки довжиною 5–7 мм і шириною 1–2 мм на лінію старту пластинки розміром 120 x 90 мм із закріпленим шаром силікагелю. Аналогічно наносять 0,05 мл 1 %-вого стандартного розчину фосфатидилхоліну.

Пластину з нанесеною пробою висушують на повітрі протягом 5–6 хвилин, після чого поміщають в камеру висотою 190–220 мм, діаметром 150–200 мм, яка містить хроматографічну систему Б і хроматографують висхідним методом. Коли фронт розчинника дійде до краю пластини, її виймають з камери, висушують на повітрі протягом 15–20 хвилин. Хроматограму проявляють парами йоду протягом 2–3 хвилин. На хроматограмі має бути видно пляму жовтого кольору на рівні плями стандартного зразка фосфатидилхоліну ($R_f 0.27 \pm 0,05$). Допускається наявність двох додаткових плям жовтого кольору фосфатидилетаноламіну ($R_f 0.4 \pm 0,05$) і лізофосфатидилхоліну ($R_f 0.11 \pm 0,03$).

2. Визначення складу куркуміноїдів отриманої ліпосомальної форми.

Визначення проводиться методом хроматографії в тонкому шарі силікагелю: 0,05 мл досліджуваного розчину за допомогою (мікропіпетки або інсулінового шприца) наносять у вигляді смужки довжиною 5–7 мм і шириною 1–2 мм на лінію старту пластинки розміром 120 x 90 мм із закріпленим шаром силікагелю. Аналогічно наносять 0,05 мл 1 %-вого стандартного розчину куркуміноїдів.

Пластину з нанесеною пробою висушують на повітрі протягом 5–6 хвилин, після чого поміщають в камеру висотою 190–220 мм, діаметром 150–200 мм, яка містить хроматографічну систему Б і хроматографують висхідним методом. Коли фронт розчинника дійде до краю пластини, її виймають з камери, висушують на повітрі протягом 15–20 хвилин. На хроматограмі досліджуваного зразка мають виявлятися три плями жовтого кольору на рівні плям стан-

дартного розчину куркуміноїдів: куркуміну (Rf 0,4), диметоксикуркуміну (Rf 0,16), бісдиметоксикурнуміну (Rf 0,08).

Примітки:

1) За відсутності комерційних пластин для тонкошарової хроматографії («Silufol», «Merck» та ін.) можливе приготування пластин за такою методикою: у ступці ретельно перемішують 3,2 г силікагелю і 7,5 мл води до отримання однорідної маси, яку наносять рівним шаром на пластинку. Пластинку висушують на горизонтальній поверхні протягом 3-х годин при температурі 20 ± 2 °С, а потім активують у сушильній шафі при температурі 110 ± 5 °С протягом 40–50 хвилин.

2) Камеру для проведення хроматографії готують за 40–50 хвилин до нанесення ліпідних зразків.



Завдання 3.

ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ФОСФАТИДИЛХОЛІНУ

Приготування розчинів:

Кислота-розщеплювач. Готують суміш кислот азотної, хлорної та сульфатної у об'ємному співвідношенні 9 : 9 : 3.

Азотна кислота, розведена. Одну частину азотної кислоти розводять двома частинами води.

Розчин амонію ванадату Р. 2,5 г амонію ванадату Р розчиняють у приблизно 500 мл киплячої води. Після охолодження розчин перемішують з 20 мл азотної кислоти та доливають воду до отримання 1000 мл загального об'єму.

Розчин амонію молібдату Р. 50 г амонію молібдату Р розчиняють у 800 мл води температурою 50°С. Після охолодження доливають воду до отримання 1000 мл загального об'єму.

Розчин-реагент. По одній частині розведеної азотної кислоти, розчину амонію ванадату Р та розчину амонію молібдату Р перемішують у вказаній послідовності. Розчин-реагент повинен бути прозорим з жовтуватим відтінком. Перед застосуванням розчин-реагент фільтрують через подвійний паперовий фільтр. Розчин придатний – 6 місяців у пляшці з темного скла.

Буферний розчин. 36 мг калію дигідрофосфату Р та 37,5 мг динатрію фосфату дигідрату Р переносять в колбу об'ємом 500 мг, розчиняють у 400 мл та доводять об'єм колби водою до мітки.

Хід роботи

Стандартний розчин. 30 мг (точна наважка) стандартного зразку фосфатидилхоліну яєчного переносять у пробірку з термостійкого скла, додають 1,5 мл кислоти-розщеплювача, накривають пробірку скляною воронкою та випарюють вміст пробірки у витяжній шафі на пісочній бані або у нагрівальному електричному блоці при температурі 200–220 °С не менше 3-х годин до утворення прозорого розчину. Кількісно переносять вміст пробірки за допомогою води у стакан місткістю 50 мл, нейтралізують його до значення рН 7 за допомогою розчину аміаку концентрованого Р1, підкислюють кількома краплями азотної кислоти розведеної до рН 5–7. Розчин має бути безбарвним. За умови зберігання кольору, процес розщеплення проводять з іншою пробою стандартної речовини. Безбарвний розчин кількісно переносять у мірну колбу ємністю 100 мл, додають 50 мл розчину-реагенту, доводять об'єм розчину водою до мітки та витримують його протягом 15 хв. Розчин використовують свіжоприготовленим.

Випробуваний розчин. 10 мл досліджуваного зразку переносять у скляну пробірку з термостійкого скла, додають 1.5 мл кислоти-розщеплювача, накривають пробірку скляною воронкою та випарюють вміст пробірки у витяжній шафі на пісочній бані або у нагрівальному електричному блоці при 200–220 °С не менше 3-х годин до утворення прозорого безбарвного розчину. Кількісно переносять вміст пробірки за допомогою води у колбу місткістю 50 мл, нейтралізують його до значення рН 7 за допомогою розчину аміаку концентрованого Р1, підкислюють кількома краплями азотної кислоти розведеної до рН 5–7. Розчин має бути безбарвним. За умови зберігання кольору, процес розщеплення проводять з іншою пробою випробуваної речовини. Безбарвний розчин кількісно переносять у мірну колбу об'ємом 100 мл, додають 50 мл розчину реагенту, доводять об'єм розчину водою до мітки та витримують його протягом 15 хв.

Розчин порівняння 1. 1.5 мл кислоти-розщеплювача переносять у пробірку та обробляють аналогічним чином.

Розчин порівняння 2. 1.5 мл кислоти розщеплювача та 1 мл буферного розчину поміщають у пробірку та обробляють аналогічним чином.

Вимірюють величину оптичного поглинання стандартного розчину при довжині хвилі 425 нм проти розчину порівняння 1 та випробуваних розчинів

при довжині хвилі 425 нм проти розчину порівняння 2. Розраховують вміст фосфатидилхоліну яєчного за трьома незалежними вимірюваннями та визначають середнє значення. Середнє значення має відповідати специфікації.

Вміст фосфатидилхоліну яєчного (X) у флаконі, у міліграмах, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{D_1 * m_0}{D_0 * V_1}$$

де D_1 – оптична густина випробовуваного розчину;

D_0 – оптична густина стандартного розчину яєчного фосфатидилхоліну;

m_0 – маса наважки стандартного зразку яєчного фосфатидилхоліну, мг;

V_1 – об'єм досліджуваного зразку, взятого на аналіз, мл.



Завдання 4.

ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ІНКАПСУЛЬОВАНОГО АКТИВНОГО ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ІНГРЕДІЄНТУ (КУРКУМІНУ)

Концентрацію куркуміну в ліпосомах визначають колориметрично після утворення кольорового комплексу з борною кислотою в присутності щавлевої кислоти при довжині хвилі 540 нм.

Приготування розчинів:

1. 80 %-вий етанол. У бутель об'ємом 1 л додають 833 мл спирту етилового 96,0 % та 167 мл води дистильованої, перемішують.

2. Реактив: по 1 г щавлевої та борної кислоти поміщають у мірну колбу об'ємом 100 мл, доводять до мітки 80 % етанолом, перемішують.

Хід роботи

Розчин А: 1 мл випробуваного розчину поміщають у мірну колбу об'ємом 25 мл, доводять до мітки 80 % етанолом.

Розчин Б: 2 мл розчину А і 1 мл реактиву поміщають у порцелянову чашку і випарюють до сухого залишку на водяній бані при 50–60 °С. Утворюється комплекс яскраво малинового кольору. Залишок кількісно змивають у мірну колбу об'ємом 25 мл і доводять до мітки 80 % етанолом.

Розчин В: 2 мл розчину А поміщають у мірну колбу об'ємом 25 мл, доводять до мітки 80 % етанолом.

За потреби розчини Б і В додатково розводять. Вимірюють оптичну густину розчину Б у порівнянні із розчином В при довжині хвилі 540 нм у кюветі шириною 1 см. Концентрацію куркуміну у випробуваному розчині (мг/мл) розраховують за формулою:

$$C_{cur} = \frac{A \cdot C_{ет.} \cdot k_{розв.}}{A_{ет.}},$$

де А – оптична густина розчину Б;

$A_{ет.}$ – питомий показник світлопоглинання кольорового комплексу 1 % розчину куркуміну у кюветі 1 см, рівний 2050;

$C_{ет.}$ – концентрація еталону, рівна 10 мг/мл;

$k_{розв.}$ – коефіцієнт розбавлення.



Контрольні запитання

1. Що таке ліпосоми? Яка їх будова?
2. Як можуть бути використані ліпосоми в біонанотехнології, біології та медицині?
3. Яка роль фосфоліпідів в біологічних мембранах.
4. Вкажіть властивості ліпідів в лікарських препаратах і обґрунтуйте переваги ліпосомальних препаратів.
5. Опишіть схему визначення фосфоліпідів в складі ліпосом.
6. Опишіть методи отримання ліпосомальних препаратів.
7. Які принципи екструзії ліпідних суспензій?
8. Опишіть основні методичні підходи до проведення хроматографії в тонкому шарі силікагелю.
9. Опишіть структуру ліпосом і вкажіть місце знаходження в ній ліпофільних і гідрофільних активних фармацевтичних інгредієнтів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм : навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД», 2020. – 279 с.
2. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Основы лабораторных исследований: практикум / Ю. М. Краснопольский, Л. В. Северина. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2017. – 208 с.
3. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине: учебное пособие / Ю. М. Краснопольский, А. С. Дудниченко, В. И. Швец. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2011. – 227 с.
4. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-ге вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.
5. Державна Фармакопея України. – 2-е вид. Доповнення 1. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. – 360 с.
6. Настанова СТ-Н міністерства охорони здоров'я 42-4.0. 2016. «Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Затверджено наказом МОЗ від 29.07. 2016.
7. Практикум по технологии лекарственных препаратов промышленного производства для студентов специальности «Технология парфюмерно – косметических средств / под ред. Е. А. Рубан. – Х. : НФаУ, 2013 – 284 с
8. Soeiro V. C. Dextran: Influence of Molecular Weight in Antioxidant Properties and Immunomodulatory Potential. / V. C. Soeiro, K. R. Melo, M. G. Alves et al. // International journal of molecular sciences. – 2016. –V. 17, No 8. – 1340.
9. Пилипенко Д. М. Виділення та очистка куркуміноїдів із кореневища *Curcuma Longa L.* / Д. М. Пилипенко, Ю. М. Краснопольський // Український біофармацевтичний журнал. – 2019. – № 4 (61) – С. 60-64.
10. Shimatsu A. Clinical application of “curcumin”, a multi-functional substance / A. Shimatsu, H. Kakeya, A. Imaizumi et al. // Anti-Aging Medicine. – 2012. – V. 9, № 1. – P. 43–51.

11. Fu Yu. Curcumin protects the rat liver from CCl₄-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation / Yu. Fu, S. Zheng, J. Lin et al. // *Molecular Pharmacology*. – 2008. – V. 73, № 2. – P. 399–409.
12. Garcia-Alloza M. Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model / M. Garcia-Alloza, L. Borrelli, A. Rozkalne et al. // *Journal of Neurochemistry*. – 2007. – V. 102, № 4. – P. 1095–1104.
13. Small G. W. Memory and brain amyloid and tau effects of a bioavailable form of curcumin in non-demented adults: a double-blind, placebo-controlled 18-month trial / G. W. Small, P. Siddarth, L. Zhaoping et al. // *The American Journal of Geriatric Psychiatry*. – 2018. – V. 26, № 3. – P. 226–277.
14. Пилипенко Д.М. Нанобиотехнологические формы гидрофобных антиоксидантов: научные основы получения, фармакологические и терапевтические свойства: в монографии «Актуальные проблемы биотехнологии и биоинженерии» / Пилипенко Д.М., Звягинцева О.В., Краснопольский Ю.М. – Харьков: Типография Мадрид, 2019. – С. 9-72.
15. Шахмаев А. Є. Технологічні принципи одержання ліпосомальних лікарських препаратів. / А. Є. Шахмаєв, Ю. М. Краснопольський, І. В. Волчик, В. І. Швець // *Український біофармацевтичний журнал*. – 2012. – Т.21, №4. – С. 4-14.
16. Krasnopolsky Yu. M. “Quality By Design” in liposomal drugs creation / Yu. M. Krasnopolsky, D. M. Pylypenko // *Biotechnologia ACTA*. – 2020. – V. 13, No. 6. – P. 5–12.
17. Пилипенко, Д. М. Применение нанобиотехнологических форм куркумина / Д. М. Пилипенко, Д. В. Безрукавый, Ю. М. Краснопольский // *Вестник НТУ «ХПИ»*, Серия: Новые решения в современных технологиях. – Харьков: НТУ«ХПИ». – 2018. – № 9 (1285). – С. 218-229.
18. Pylypenko D. Nanobiotechnological obtaining of liposomal forms of antioxidant preparations based on bioflavonoids / D. Pylypenko, V. Prokhorov, O. Dudnichenko, Y. Krasnopolsky // *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. – 2019. - № 6 (22) – С. 11-15.
19. Feng T. W. Liposomal Curcumin and its application in cancer. / T. W. Feng, R. J. Lee, L. Zhao // *International Journal of Nanomedicine*. – 2017. – V. 12. – P. 6027–6044.
20. Rogers N. M. Amelioration of renal ischaemia–reperfusion injury by liposomal delivery of curcumin to renal tubular epithelial and antigen-presenting cells /

N. M. Rogers, M. D. Stephenson, A. R. Kitching et al. // *British Journal of Pharmacology*. – 2012. – V. 166. – P. 194–209.

21. Sokolik V. V. Effect of curcumin liposomal form on angiotensin converting activity, cytokines and cognitive characteristics of the rats with Alzheimer's disease model. / V. V. Sokolik, S. M. Shulga // *Biotechnologia Acta*. – 2015. – V. 8, № 6. – P. 48–56.

22. Li L. Liposome encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling and angiogenesis. / L. Li, F. S. Braiteh, R. Kurzrock // *Cancer*. – 2005. – V. 104, № 6. – P. 1322–1331.

23. Li R. Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer / R. Li, B. Ahmed, K. Mehta, R. Kurzrock. // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2007. – V. 6, № 4. – P. 1276–1282.

24. Dhule S. S. Curcumin loaded-cyclodextrin liposomal nanoparticles as delivery vehicles for osteosarcoma / S. S. Dhule, P. Penfornis, T. Frazor et al. *Nanomedicine*. 2012. Vol. 8, № 4. P. 440–451.

25. Lu Y. Curcumin micelles remodel tumor microenvironment and enhance vaccine activity in an advanced melanoma model / Y. Lu, L. Miao, Y. Wang et al. // *Molecular Therapy*. – 2016. – V. 24, № 2. – P. 364–374.

26. Alemi A. Paclitaxel and curcumin coadministration in novel cationic PEGylated niosomal formulations exhibit enhanced synergistic antitumor efficacy / A. Alemi, J. Zavar Reza, F. Haghirsadat et al. // *Journal of nanobiotechnology*. – 2018. – V. 16, № 1. – Article ID 28.

ЗМІСТ

Вступ.....	3
Лабораторна робота 1. Дослідження розчину бактеріального декстрана в препараті «Реополіглюкін».....	4
Контрольні запитання.....	11
Лабораторна робота 2. Одержання екстрактів за допомогою апарату Со-кслета.....	12
Контрольні запитання.....	31
Лабораторна робота 3. Методи одержання ліпосомальних форм та їх кон-троль.....	32
Контрольні запитання.....	49
Список літератури.....	50

Навчальне видання

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до виконання лабораторних робіт
з курсу «Біотехнології виробництва готових лікарських форм»
для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Укладачі: КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ Юрій Михайлович
ПИЛИПЕНКО Дар'я Михайлівна

Відповідальний за випуск проф. Близнюк О. М.
Роботу до видання рекомендував проф. Циганков О. В.
В авторській редакції

План 2021 р., поз. 242.

Підп. до друку 28.10.21. Формат 60×84 1/16. Папір офсетний.

Друк – ризографія. Гарнітура Times New Roman. Ум. друк. арк. 3,2.

Наклад 50 прим. Зам. № 3016 Ціна договірна.

Видавничий центр НТУ «ХП».

Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 5478 від 21.08.2017 р.

61002, Харків, вул. Кирпичова, 2

Віддруковано ТОВ «Друкарня Мадрид»

61024, м. Харків, вул. Максиміліанівська, 11. Тел.: 0800 33 67 62

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи Серія ДК № 4399 від 27.08.2012 р.

www.madrid.in.ua

info@madrid.in.ua