



Zāļu formu tehnoloģijas katedra

Irēna Daberte

**SKUJU BIEZĀ EKSTRAKTA KAPSULĒTAS FORMAS
TEHNOLOĢIJA UN IZPĒTE**

Promocijas darbs

Specialitāte – Farmācija

Darba zinātniskā vadītāja:

Dr. pharm., asociētā profesore Ilze Bārene,
RSU Zāļu formu tehnoloģijas katedras vadītāja



Promocijas darbs tapis ar ESF projekta

„Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei
Rīgas Stradiņa universitātē” atbalstu

Rīga – 2010

SATURS

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	4
IEVADS	5
Darba aktualitāte	5
Darba mērķis un uzdevumi	7
Darba novitāte un praktiskā nozīme	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	8
1.1. Skuju biomasas pārstrāde	8
1.1.1. Meži kā bioloģiski aktīvu dabas vielu avots	8
1.1.2. Parastā priede	8
1.1.3. Skuju biomasas pārstrādes tehnoloģijas	10
1.2. Skuju biežā ekstrakta bioloģiski aktīvās vielas	12
1.2.1. Karotinoīdi	13
1.2.2. Hlorofila atvasinājumi	17
1.2.3. Citi savienojumi	21
1.2.4. Skuju biežā ekstrakta preklīniskā un klīniskā izpēte	23
1.3. Dozētas formas izstrāde	26
1.3.1. Perorāla dozēta forma – kapsula	26
1.3.1.1. Izejvielas kapsulu pagatavošanai	28
1.3.1.1.1. Želatīns	30
1.3.1.2. Kapsulu pagatavošanas metodes	31
1.3.1.2.1. Iemērkšanas metode	31
1.3.1.2.2. Presēšanas metode	32
1.3.1.2.3. Pilināšanas metode	33
1.3.1.3. Kompozīcijas kapsulu pildīšanai	35
1.3.1.3.1. Kapsulu pildīšana ar cietas konsistences pildījumiem	35
1.3.1.3.2. Kompozīcijas mīksto kapsulu pildīšanai	36
1.3.1.3.3. Šķidrumu un puscieto masu pildīšana cietajās kapsulās	38
1.3.2. Lipīdus saturošas aktīvo vielu piegādes sistēmas	39
1.3.2.1. Lipīdi un aktīvo vielu absorbcija	39
1.3.2.2. Lipīdu šķīdumi un emulsijas	41
1.3.2.2.1. Nejonogēnās virsmas aktīvās vielas	42
1.3.2.2.1.1. Monoglicerīdi	42
1.4. Dozēto formu stabilitāte	43
1.4.1. Krustenisko saišu veidošanās želatīnā	45
2. MATERIĀLI UN METODES	47
2.1. Materiāli	47
2.1.1. Izejviela	47
2.1.1.1. SBE iegūšanas process	47
2.1.2. Citas aktīvās vielas un palīgvielas	47
2.1.3. Reaktīvi	49
2.1.4. Aparatūra un ierīces	50
2.2. Metodes	50
2.2.1. SBE un to saturošo preparātu ārējā izskata, krāsas, smaržas un garšas noteikšana	50
2.2.2. SBE identitātes noteikšana	50
2.2.2.1. Hlorofila pierādīšana	50
2.2.2.2. Karotinoīdu un nepiesātināto ogļūdeņražu pierādīšana	51
2.2.2.3. Karotinoīdu identificēšana ar plānslāņa hromatogrāfiju	51
2.2.3. Masas zuduma žāvējot noteikšana SBE un to saturošos preparātos	51
2.2.4. Ūdeņraža eksponenta (pH) noteikšana SBE	52
2.2.5. Karotīnu saturs noteikšana SBE un to saturošos preparātos	52
2.2.5.1. Karotīnu summas kvantitatīvā noteikšana SBE ₁ un SBE ₂	54
2.2.5.2. Karotīnu summas kvantitatīvā noteikšana SBE ₂ saturošajās kapsulās (modificētā metode)	55
2.2.6. SBE ₁ saturošo pulveru birstamības noteikšana	56
2.2.7. SBE ₂ saturošo mīksto želatīna kapsulu dozēšanas precizitātes noteikšana	57
2.2.8. SBE ₂ saturošo mīksto želatīna kapsulu sairšanas laika noteikšana	57

2.2.9. SBE saturošo preparātu stabilitātes pētījumi	58
2.2.10. Datu statistiskā apstrāde	58
3. REZULTĀTI	
3.1. SBE īpašību izpēte, kvalitātes novērtēšana un karotīnu satura noteikšanas metodes	
izstrāde SBE dozētā formā	59
3.1.1. SBE šķīdības noteikšana	59
3.1.2. SBE kvalitatīvā sastāva noteikšana ar plānslāņa hromatogrāfijas metodi	59
3.1.3. SBE kvalitatīvā sastāva noteikšana ar kolonnas hromatogrāfijas un UV/VIS spektrofotometrijas metodi	62
3.1.4. Pētījumā izmantoto SBE sēriju kvalitātes novērtēšana	69
3.1.5. Karotīnu summas SBE ₂ MŽK kvantitatīvās noteikšanas metodes pamatojums	69
3.1.6. Karotīnu summas SBE ₂ MŽK kvantitatīvās noteikšanas metodes validācija	71
3.2. Palīgvielu un tehnoloģisku paņēmieni pielietošanas iespējas izpēte SBE dozētas formas izveidošanai	73
3.2.1. SBE ₁ saturošu pulveru sastāvu pildīšanai cietajās želatīna kapsulās tehnoloģijas izstrāde	73
3.2.1.1. SBE ₁ saturošu pulveru sastāvu I varianta pagatavošana	73
3.2.1.2. SBE ₁ saturošu pulveru sastāvu II varianta pagatavošana	75
3.2.2. SBE saturošu mīksto želatīna kapsulu tehnoloģijas izstrāde	77
3.2.2.1. Iemērķšanas metode MŽK pagatavošanai	77
3.2.2.2. SBE ₁ kompozīciju pagatavošana pildīšanai MŽK	79
3.2.2.3. Žāvēta SBE ₁ kompozīciju pagatavošana pildīšanai MŽK	80
3.2.2.4. SBE ₂ saturošu MŽK laboratorijas sērijas pagatavošana ar iemērķšanas metodi	81
3.2.3. Cieto kapsulu pildīšana ar SBE ₂ saturošu sastāvu	84
3.2.4. Ražošanā izmantojamo kapsulu iegūšanas metožu pielietošanas iespējas SBE ₂ saturoša sastāva iekapsulēšanai	86
3.2.4.1. Pilināšanas metodes izmantošana MŽK pagatavošanai ar SBE ₂ saturošu sastāvu	86
3.2.4.2. Presēšanas metodes izmantošana MŽK pagatavošanai ar SBE ₂ saturošu sastāvu	87
3.2.5. MŽK pildījuma SBE ₂ saturoša sastāva dispersās sistēmas raksturojums	90
3.3. SBE ₂ dozētas formas stabilitātes izpēte	91
3.3.1. SBE ₂ MŽK laboratorijas sērijas stabilitāte	91
3.3.2. SBE ₂ MŽK pilotsēriju stabilitāte	94
3.3.3. SBE ₂ MŽK ražošanas sēriju stabilitāte	96
3.3.4. Iepakojuma ietekme uz SBE ₂ MŽK stabilitāti	99
3.3.5. SBE ₂ MŽK sairšanas īpatnības	99
3.3.6. SBE ₂ MŽK uzglabāšanas laika prognozēšana	101
4. DISKUSIJA	105
4.1. SBE īpašību izpēte, kvalitātes novērtēšana un karotīnu satura noteikšanas metodes izstrāde SBE dozētā formā	105
4.2. Palīgvielu un tehnoloģisku paņēmieni pielietošanas iespējas izpēte SBE dozētas formas izveidošanai	110
4.3. SBE ₂ dozētas formas stabilitātes izpēte	115
5. SECINĀJUMI	120
6. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS	122
7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA UN INFORMĀCIJAS AVOTI	123
PIELIKUMI	138
1. pielikums. Napolāros šķīdinātajos iegūto priedes zaleņa ekstraktvielu vidējais sastāvs.....	139
2. pielikums. SBE kvalitātes rādītāji	142
3. pielikums. I varianta SBE ₁ saturošu pulveru sastāvi	143
4. pielikums. SBE ₂ MŽK laboratorijas sērijas stabilitāte	144
5. pielikums. SBE ₂ MŽK 1. pilotsērijas stabilitāte	146
6. pielikums. SBE ₂ MŽK 2. pilotsērijas stabilitāte	148
7. pielikums. SBE ₂ MŽK 3. pilotsērijas stabilitāte	150
8. pielikums. SBE ₂ MŽK I ražošanas sērijas stabilitāte	152
9. pielikums. SBE ₂ MŽK II ražošanas sērijas stabilitāte	154
10. pielikums. Skuju biežā ekstrakta 300 mg kapsulu kvalitātes specifikācijas projekts	156
11. pielikums. Skuju biežā ekstrakta 300 mg kapsulu kvalitātes kontroles metodes	157
PATEICĪBAS	161

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

λ – viļņa garums, nm

ABPE – augsta blīvuma polietilēns

Al/PVH blisteri – alumīnija folijas un polivinilhlorīda plēves blisteri

BAV – bioloģiski aktīvās vielas

GMO – glicerīna monooleāts

MŽK – mīkstā želatīna kapsula

n – analizēto paraugu skaits

NMP – ne mazāk par

NVP – ne vairāk par

pH – ūdeņraža eksponents

PSH – plānslāņa hromatogrāfija

r – korelācijas koeficients

R^2 – determinācijas koeficients

R_f – retardācijas faktors

RM – relatīvais mitrums

RSD – relatīvā standartnovirze

SBE – skuju biezais ekstrakts

SBE₁ – skuju biezais ekstrakts ar mitruma un gaistošo vielu saturu ne vairāk par 40 %

SBE₂ – skuju biezais ekstrakts ar mitruma un gaistošo vielu saturu ne vairāk par 10 %

SD – standartnovirze

UV/VIS – ultravioletā un redzamā gaismas spektra daļa

VAV – virsmas aktīvā viela

ZBPE – zema blīvuma polietilēns

IEVADS

Darba aktualitāte

Dažādu slimību ārstēšanā un profilaksē plaši lieto augu izcelsmes preparātus. Šie preparāti satur gan vielas ar izteiktu farmakoloģisku iedarbību, gan cilvēka organismam nepieciešamos vitamīnus, minerālvielas, nepiesātinātās taukskābes, antioksidantus u.c. bioloģiski aktīvās vielas, kuras pozitīvi ietekmē organisma trofiskos un reparatīvos procesus.

Augu izcelsmes līdzekļiem piemīt unikālas īpašības, kuru nav sintētiskajiem preparātiem. Daba paredz sarežģīto savienojumu daudzveidību, bioloģiski aktīvo vielu kompleksus, kuri nodrošina terapeitisku aktivitāti vai profilaktiskās īpašības, kuras nevar izpausties, lietojot komponentus atsevišķi [1]. Pasaulē aptuveni 25 % no recepšu zālēm satur vismaz vienu komponentu, kas tiek iegūts, vai kādreiz tika iegūts no augiem [1, 2].

Starp kokiem, kuriem piemīt ārstnieciskās īpašības, nozīmīga vieta ir meža jeb parastajai priedei (*Pinus sylvestris*, L.). Kā evolucionāri senākās sēklaugu grupas augs, tā spējusi izdzīvot un pielāgoties nelabvēlīgiem apstākļiem, izstrādājot unikālu bioloģiski aktīvo vielu kompleksu, kuru plaši izmanto zinātniskajā un tautas medicīnā [3].

Attīstoties meža bioķīmijai, ir izveidotas skujkoku zaļās masas, kas ir kokmateriālu ražošanas atkritumi, pārstrādes tehnoloģijas, kuras ļauj iegūt vērtīgās dabas vielas izmantošanai medicīnā, kosmētikā, lauksaimniecībā, rūpniecībā u.c. nozarēs.

Latvijas meži ir uzskatāmi par ekoloģiski tīru augu valsts izejvielu ieguves avotu [4, 5]. A/S „Biolat” no priežu skužām un jauniem dzinumiem ražo biezo ekstraktu, kas satur hlorofilus, karotinoīdus, poliprenolus, E un K vitamīnu, nepiesātinātās taukskābes, fitosterīnus u.c. bioloģiski aktīvās vielas [6, 7].

Mūsdienu sabiedrībā ir aktuālas nepareiza dzīvesveida problēmas: nepilnvērtīgs uzturs, mazkustīgums, stress, apkārtējās vides piesārņojums, un ar to saistītās sekas – kuņģa un zarnu trakta slimības, imunitātes pazemināšanās u.c. kaites. Ārstniecības augi var palīdzēt cīņā ar šīm problēmām. Plaši tiek pētītas augu izcelsmes bioloģiski aktīvās vielas, kurām piemīt kompleksa iedarbība uz kuņģa un divpadsmitpirkstu zarnas čūlu, vienlaikus uzrādot reparatīvu un antioksidanta efektu, sevišķi gadījumos, kad ir diagnosticēta čūlas slimība un *Helicobacter pylori* infekcija [8–15].

Šādu kompleksu iedarbību kuņģa un zarnu trakta slimību ārstēšanā un profilaksē uzrāda priežu skuju biežais ekstrakts. Preklīniskajos pētījumos noskaidrots, ka skuju biežajam ekstraktam piemīt gastroprotektīvā iedarbība un reparatīva iedarbība uz eksperimentālām

kuņģa čūlām, baktericīda iedarbība uz grampozitīvo mikrofloru, gramnegatīvām baktērijām *Pseudomonas aeruginosae*, antioksidatīva darbība, vāja imūnmodulējoša darbība [16–21]. Ekstraktam nav kairinošas, alergizējošas iedarbības, kancerogēnu, teratogēnu un mutagēnu īpašību, un tas nav toksisks siltasiņu dzīvniekiem [18].

Skuju biezā ekstrakta klīniskā izpēte parādīja, ka preparāts ir labi panesams, neskatoties uz tā specifiskām organoleptiskām īpašībām. Skuju biezā ekstrakta efekts saistīts ar sekretoriskā A imūnglobulīna izdales stimulāciju siekalās, mikrocirkulācijas uzlabošanu, gļotu sekrēcijas stimulāciju kuņģa un divpadsmitpirkstu zarnas gļotādā [16]. Skuju biezā ekstrakta lietošanas indikācijas ir hronisks aktīvs gastrīts (pārsvarā B tipa), palīgterapija hroniskas gastroduodenālas čūlas un aktīva gastrīta gadījumā, ulceroza un neulceroza dispepsija [16]. Priežu skuju biežais ekstrakts var papildināt un optimizēt pacientu ar pēcradiācijas sindromu ārstēšanu [22].

Priežu skuju biežais ekstrakts ar nosaukumu “Fitestens” Latvijā tika lietots kā gastroprotektors no 1995. līdz 2005. gadam. Kā zāļu forma tas bija pildīts tumša stikla burkāšos pa 50 g vai 100 g, un tā dozēšanai izmantoja karotīti. Neskatoties uz augstu ārstniecisku efektivitāti un pietiekamu izejvielas daudzumu, šo zāļu realizācijas apjomi nebija lieli. Iespējams, tas daļēji saistīts ar to, ka skuju biezā ekstrakta zāļu forma nebija pietiekami ērta lietošanā: tā nebija dozēta, un, lietojot biezo ekstraktu perorāli, bija jūtama specifiska, rūgta garša.

Latvijas zāļu reģistrā un uztura bagātinātāju reģistrā nav analoģu produktu. Uztura bagātinātāju reģistrā ir reģistrēti hlorofilīnu, kā arī karotīnus saturošie preparāti. Krievijā ir reģistrēti skuju hlorofila-karotīna pastu saturošie uztura bagātinātāji *Lesmin* un *Feokarpin* tablešu un cieto kapsulu formā. Austrālijā reģistrēts skujuzaļu skuju kompleksu (*conifer green needle complex – CGNC*) saturošs uztura bagātinātājs *Bioeffectives 320* kapsulās.

Nemot vērā iepriekš minēto, var secināt, ka skuju biezā ekstrakta dozētas formas izstrāde ir aktuāls uzdevums.

Kuņģa un zarnu trakta slimību ārstēšanā un profilaksē galvenokārt izmanto perorālās dozētas formas, kuru vidū viena no optimālākām ir kapsulas. Kapsulas ir precīzi dozētas, ērti lietojamas, tās maskē preparāta nepatīkamo garšu un smaržu, nodrošina aktīvo vielu stabilitāti [23–25]. Tāpēc kapsulas ir izvēlētas kā skuju biezā ekstrakta dozētā forma.

Izstrādājot preparāta dozēto formu, ir svarīgi izpētīt aktīvās vielas īpašības, piemēklēt optimālas palīgvielas, veicināt tehnoloģiju ieviešanu rūpnieciskajā ražošanā, izstrādāt

produkta kvalitātes noteikšanas metodes, izvēlēties piemērotu iepakojumu. Visu šo uzdevumu risināšanai ir veltīts šis pētījums.

Darba mērķis un uzdevumi

Darba mērķis: izstrādāt skuju biezā ekstrakta kapsulētu formu un izpētīt tās kvalitāti un stabilitāti.

Darba uzdevumi:

1. Izpētīt skuju biezā ekstrakta sastāvā esošo karotinoīdu un hlorofilu kā kvalitātes marķieru īpašības.
2. Izstrādāt skuju biezo ekstraktu saturošu pulverveida sastāvu pildīšanai cietajās želatīna kapsulās un novērtēt tā kvalitāti un stabilitāti.
3. Izstrādāt skuju biezo ekstraktu saturošu lipofilu sastāvu pildīšanai mīkstajās un cietajās želatīna kapsulās, izmantojot piemērotās palīgvielas un tehnoloģiskus paņēmienus, novērtēt tā kvalitāti un stabilitāti.
4. Izvērtēt dažādu iekapsulēšanas metožu pielietošanas iespējas skuju biezā ekstrakta dozētas formas pagatavošanai.
5. Izstrādāt skuju biezā ekstrakta kapsulētas formas kvalitātes kontroles metodes.
6. Izpētīt skuju biezā ekstrakta kapsulētas formas stabilitāti dažādos iepakojuma veidos ilgtermiņa un paātrinātās glabāšanas apstākļos.

Darba novitāte un praktiskā nozīme

1. Izstrādāta skuju biezā ekstrakta perorāla dozēta forma un izpētīta tās stabilitāte.
2. Izstrādātās skuju biezā ekstrakta mīkstās želatīna kapsulas reģistrētas LR Pārtikas centrā uztura bagātinātāju reģistrā ar nosaukumu „Fitestens”.
3. Sagatavots skuju biezā ekstrakta mīksto želatīna kapsulu ražošanas procesa apraksta projekts, izstrādātas kvalitātes kontroles metodes un kvalitātes specifikācijas projekts.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Skuju biomasas pārstrāde

1.1.1. Meži kā bioloģiski aktīvu dabas vielu avots

Meži ir viena no galvenajām Latvijas nacionālajām bagātībām. Pēc meža statistiskās inventarizācijas datiem mežs un meža kritērijiem atbilstošās lauksaimniecības zemes Latvijā aizņem 3,22 milj. ha jeb 49,9 % no valsts teritorijas. Salīdzinājumam, pasaulē kopumā meži aizņem 30,3 % teritorijas, bet Eiropā 44,3 % [26]. Latvijas mežaudzes pārsvarā veido trīs valdošās koku sugas – priede, egle un bērzs, kuru audzes kopā aizņem 74 % no visas meža platības. Priežu audzes aizņem 29 % no mežaudžu kopplatības, egļu audžu īpatsvars ir 17 % [27].

Mežs kā viena no tīrākajām ekosistēmām tiek uzskatīts par perspektīvu avotu augstvērtīgu un lētu izejvielu ieguvei. Ķīmiskiem savienojumiem bagātais sastāvs un izmantošanas iespējas visa gada laikā padara skujkoku zāleni (skujas un nepārkoksnējušos dzinumus) pievilcīgu kā izejvielu dažādu organisku savienojumu, t.sk. bioloģiski aktīvo vielu, iegūšanai. Latvijā ik gadu cirmās paliek līdz 0,8 milj. tonnu koku zaleņa – ekoloģiski tīras izejvielas ar augstu bioloģiski aktīvo dabas vielu saturu [4, 5, 28]. Latvijas Valsts mežzinātnes institūtā „Silava” veic meža nekoksnes izejvielu izpēti un produktu izstrādi [29]. Pārstrādājot egles un priedes zāleni, a/s „Biolat” Latvijā iegūst dažādus produktus pārtikas, farmācijas, lauksaimniecības, kosmētikas, sadzīves ķīmijas u.c. vajadzībām [6, 30, 31]. Pētījumi par koku nekoksnes daļas (mizas un zaleņa) izmantošanu tiek veikti arī Kanādā, Krievijā, Somijā, Austrālijā, Ķīnā, ASV u.c. valstīs [28, 32–37].

1.1.2. Parastā priede

Parastā priede (*Pinus sylvestris* L.) ir viena no visplašāk izplatītajām Eirāzijas skujkoku sugām [38]. Tā sastopama visā Latvijā, vietām veido tīraudzes (silus), aug arī jauktos mežos, smilšainā, retāk – purva augsnē [3].

Parastā priede ir mūžzaļš, līdz 40 m augsts priežu (*Pinaceae*) dzimtas skujkoks ar sarkanbrūnu, krevainu mizu. Skujas zilganzaļas, pa divām kopā uz īsvasām. Augs ir vienmājnieks. Vīrišķajiem čiekuriem ir daudz putekšņlapu, apputekšņošana notiek ar vēja palīdzību. Sievišķie čiekuri ir zaļi, vēlāk tie kļūst pelēkbrūni. Sēklas ar lidspārnu nogatavojas otrajā gadā [3].

Izmanto parastās priedes jaunus pumpurus un priežu skuju, kas ievāktas no jauniem zariem, vai zaru galotnes ar jaunām skujām un pumpuriem. Priežu pumpuru un skuju uzlējumu vai novārījumu lieto saaukstēšanās slimību, augšējo elpceļu iekaisuma, akūta un hroniska bronhīta gadījumā. No priežu skujām gatavoto uzlējumu lieto arī kā vitamīnu dzērienu, bet iegūto ēterisko eļļu izmanto inhalācijām. Skuju ekstrakts tiek izmantots ārstnieciskām vannām reimatisma, nervu, sirds asinsvadu slimību gadījumā. Skuju hlorofila-karotīna pastu izmanto arīgai lietošanai, tā ir mutes dobuma higiēnas līdzekļu sastāvā [3].

Priežu ēteriskā eļļa iedarbojas kairinoši. Tai piemīt izteikta pretiekaisuma, baktericīda, bronholītiska, diurētiska, pretspāpju, gremošanu stimulējoša un žultsdzinēja aktivitāte. No priedēm 5 – 10 gadus pirms to nociršanas tecina sveķus – dabīgo priežu balzamu. Sveķus pārdestilē, lai iegūtu terpentīneļļu, kurai piemīt dezinficējoša un kairinoša iedarbība, un kolofoniju. Frakcionēti destilējot terpentīneļļu, iegūst tā saukto „smago eļļu”, kas ietilpst dažādos medicīniskos preparātos, kurus lieto kā spazmolītiskus un bakteriostatiskus līdzekļus. No priežu celmiem, kas atradušies zemē 5 – 10 gadus, sausā pārtvaicē iegūst darvu, kuru izmanto kā dezinficējošu līdzekli, tehnisko terpentīnu un ogli [3].

Priežu skuju ķīmiskais sastāvs un bioloģiski aktīvās vielas tiek plaši pētītas. Literatūrā ir dati, ka priežu skuju un jaunie dzinumi satur ēterisko eļļu (~1,7 %), kuras galvenie komponenti ir mono- un seskviterpēni (α - un β -pinēns, kamfēns, mircēns, Δ^3 -karēns, limonēns, β -fellandrēns, α -terpinēns, α -terpineols, terpinolēns, kariofilēns, α -selinēns, α -, γ -murolēns, δ -kadinēns, spatulenols, δ -kadinols u.c.), kampars, borneols, izoborneols, bornilacetāts, bisabolols u.c. [39 – 41]. Skuju sastāvā ir hlorofili, karotinoīdi: β -karotīns (līdz $67 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), luteīns (līdz $120 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), neoksantīns (līdz $38 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), violaksantīns (līdz $42 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) u.c. [42, 43], flavonoīdi: kvercetinā, mircetinā un kempferola atvasinājumi (ampelopsīns, taksifolīns, izokvercetinā, astragalīns, izoramnetīns, trifolīns, hiperīns, izomircitrīns u.c.), miecvielas (līdz 5 %): katehīns, gallokatehīns u.c. [44]. Priežu skuju ir bagātas ar vitamīniem: askorbīnskābi (0,1 – 0,3 %), K vitamīnu ($16 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ filohinona [45]), E un B grupas vitamīniem; minerālvielām un mikroelementiem (kāliju, kalciju, magniju, fosforu, mangānu, cinku, dzelzi, boru, alumīniju, niķeli, selēnu, hromu, jodu) [3]; aminoskābēm [46]. Skujas satur alilglicerīdus, fosfo- un glikolipīdus, sterīnus un to ēsterus ar taukskābēm (oleīnskābi, linolēnskābi, linolskābi, palmitīnskābi) [47], p-sitosterīnu-3-o-p-o-glikopiranozīdu; fenolsavienojumus: kanēļskābi, p-kumārskābi, p-hidroksifeniletanolu, gvajaciletanolu, havikolu, eigenolu, izoeigenolu, koniferilaldehīdu, pinosilvīna monometilēsteri, dimetoksirezveratrolu, ferūlskābi, dihidrokoniferilspirtu, pinorezinolu [48];

izoabienolu, poliprenolus, epimanoiloksīda-19-skābi [49]; vaskus u.c. vielas [37]. Bioloģiski aktīvo vielu sastāvs priežu zalenī mainās atkarībā no koku vecuma, gadalaika, augšanas vietas, apkārtējās vides klimatisko un ekoloģisko faktoru ietekmes [36, 37, 40, 43, 44, 46, 49].

Literatūras dati, zinātniskās un tautas medicīnas pieredze liecina, ka parastā priede ir ļoti vērtīgs ārstniecības augs, kuram piemīt daudzveidīga bioloģiskā aktivitāte.

1.1.3. Skuju biomasas pārstrādes tehnoloģijas

Attīstoties zinātnes jaunajam virzienam – meža bioķīmijai, zinātnei par koka dzīvo elementu identifikāciju, ekstrakciju un utilizāciju – skujkoku zaleņa produktu izmantošana ieguva zinātnisku pamatojumu.

Meža bioķīmijas attīstības pirmsākumi meklējami Krievijā pagājušā gadsimta 40-jos gados. Tās pamatlicējs ir Ļeņingradas (tagad Sankt-Pēterburgas) meža tehniskās akadēmijas profesors F. T. Solodkijs, kurš uzsāka pētījumus par koku zaļās masas racionālo izmantošanu un bioloģiski aktīvo vielu iegūšanu no priedes un egles skujām, un izstrādāja skuju hlorofilakarotīna pastas ražošanas tehnoloģiju [50].

Meža bioķīmijas attīstības rezultātā izveidoti koku zaleņa izmantošanas divi virzieni: skuju komplekso preparātu iegūšana un individuālo bioloģiski aktīvo savienojumu izdalīšana. Zaleņa pārstrādes tehnoloģiju pamatā ir ekstraktu iegūšana ar polāriem vai nepolāriem šķīdinātājiem un to sadalīšana grupās vai tīrvielās, pielietojot dažādus ķīmiskās tehnoloģijas paņēmienus [51].

Kā izejvielu izmanto priedes, egles un baltegles zaleņi – skujas un nepārkoksnējušos zariņus diametrā līdz 6 mm, kas satur apmēram 80 % skuju [36]. Izdalot bioloģiski aktīvās vielas (BAV), ņem vērā komponentu sastāva un to daudzuma izmaiņas gada cikla laikā, atkarībā no augšanas vietas, skujkoku sugas, izejmateriāla uzglabāšanas procesa u.c. [36, 52], kā arī izvērtē koku zaleņa piesārņojumu ar pesticīdiem un smagajiem metāliem [4, 51].

Priedes zaleņa pārstrādei visbiežāk lieto F. T. Solodkija izstrādāto metodi, kuras pamatā ir lipīdu kompleksa izdalīšana, izmantojot ekstrakciju ar benzīnu ar tai sekojošu lipīdu hidrolīzi ar nātrija sārma ūdens šķīdumu. Pēc šīs metodes iegūst skuju hlorofilakarotīna pastu (skuju biezo ekstraktu), kas satur hlorofila atvasinājumus, karotinoīdus, tokoferolus, sterīnus u.c. BAV, un kā blakusproduktus – skuju ūdens ekstraktu, skuju vasku, ēterisko eļļu un skuju miltus. Pārstrādājot priedes un egles zaleņi kopā vai tikai egles zaleņi, iegūst nātrija hlorofilīnu, provitamīnu koncentrātu, kas satur karotīnus, sterīnus un

tokoferolus, balzamisku pastu, kas satur hlorofila atvasinājumus, sveķskābes, taukskābes u.c. vielas, un dažādas ēteriskās eļļas frakcijas [36].

Risinot koku zaleņa pārstrādes jautājumus, pētījumā [52] ir salīdzināti divu Latvijas galveno koku sugu ekstraktvielu iznākumi dažādos periodos. Ir secināts, ka izdevīgākais skujkoku zaleņa pārstrādes laiks maksimālā produkcijas iznākuma iegūšanai ir rudens – ziemas periods, kaut gan normatīvās dokumentācijas prasībām atbilstošu produkciju var iegūt jebkurā gadalaikā. Produktu vidējais iznākums attiecīgi no egles un priedes zaleņa ziemas periodā ir (% no abs. sausa zaleņa): ēteriskās eļļas – 0,14 un 0,25; ūdenī šķīstošo vielu – 1,47 un 1,25; lipīdu – 6,95 un 8,25; nātrija hlorofilīna – 1,09 un 0,98; provitamīnu koncentrāta – 2,78 un 2,45. Egles zalenis satur vairāk poliprenolu (1,2 – 1,5 %), salīdzinot ar priedes zaleņi (0,6 – 0,8 %) un hlorofila (1,09 % eglei un 0,95 % priedei). Lipīdu iznākums no priedes zaleņa ir lielāks galvenokārt uz sveķskābju rēķina. Egles zaleņa pārstrādei priekšroka ir dodama tad, kad vairāk tiek pieprasīti hlorofila un provitamīnu koncentrāta pārstrādes produkti, kā arī ūdens ekstrakts, bet priedes zaleņa pārstrādei – kad ir pieprasīta skuju vitamīnu pasta un hlorofila karotīna pasta (skuju biežais ekstrakts) [52].

Optimizējot skujkoku zaleņa pārstrādes procesu, tiek veikti ekstrakcijas procesa intensifikācijas pētījumi. Piedāvāts izmantot zaleņa ekstrakcijai nepārtrauktas darbības pretplūsmas aparātus, kā arī intensificēt ekstrakcijas procesu rotorpulsācijas aparātos [53, 54]. Citi autori piedāvā izmantot ultraskaņu ekstrakcijas procesā [36].

Ir parādīts, ka skujkoku zaleņa ekstrakcijas process ar nepolāriem šķīdinātājiem (benzīnu, Nefrāzi, heksānu, petrolēteri), kuram seko apziepjošana augstā temperatūrā 70 – 80 °C, veicina BAV ķīmiskas izmaiņas [37, 55, 56]. Tāpēc notiek citu perspektīvu šķīdinātāju meklējumi. Bija parādīts, ka svarīga loma ekstrakcijā ir ekstraģenta dabai (minimums vielu tiek izvilktas ar nepolāro šķīdinātāju, maksimums – ar polāro) [57]. Zaleņa ekstrakcijai piedāvā izmantot trihloretilēnu un izopropilspirtu, kā arī dažādas koncentrācijas etilspirtu un ūdeni, kas palielina ekstraktīvo vielu iznākumu [58]. Kaut gan, pētot etanola un Nefrāzes ekstraktus, konstatēts, ka minerālvielas un metāli tajos pāriet nelielos daudzumos, salīdzinot ar ūdens ekstraktiem [4].

Ekstraktvielu iegūšanai no augu materiāla piedāvā izmantot sašķidrinātās gāzes. Kā priekšrocību var minēt ekstrakcijas zemu temperatūru (18 – 30 °C), kas ļauj iegūt vielas praktiski natīvā stāvoklī. Sašķidrināto gāzu izmantošana vienkāršo ekstrakcijas procesa tehnoloģisko shēmu, jo izslēdz ekstraģenta reģenerācijas stadiju. Plaši tiek izmantota BAV ekstrakcija ar sašķidrināto ogļskābo gāzi [37, 55]. Kā negatīvo momentu var minēt samērā

nelielu ekstraktīvo vielu saturu ekstraktos. Tāpēc sašķidrināto ogļskābo gāzi izmanto pārsvarā izejvielas kompleksajā pārstrādē. Ekstrakcijai izmanto arī sašķidrināto propānu un/vai butānu (20 – 26) °C temperatūrā un 0,07 Mpa spiedienā. Iegūtie ekstrakti satur hlorofilus, karotinoīdus, taukos šķīstošos vitamīnus, sterīnus, ēteriskās eļļas, vaskus, poliēnu savienojumus [55].

Tiek veikti atsevišķu bioloģiski aktīvo savienojumu izdalīšanas pētījumi no skujkoku zaleņa. Ir izstrādāta emulsijas metode lipīdu, t.sk. terpenoīdu iegūšanai no skujkoku zaleņa, izmantojot nātrija sārmu ūdens šķīdumu. Metode balstās uz virsmas aktīvo vielu (VAV) – taukskābju un sveķskābju sāļu veidošanos ekstrakcijas vidē, lipīdu ekstrakciju ar emulsijas palīdzību, ar sekojošu produktu izdalīšanu ar petrolēteri un spirtu. Šādā veidā iegūst neitrālo vielu koncentrātu (provitamīnu koncentrātu), lipīdu koncentrātu, poliprenolus, balzamisko pastu. Izveidota poliprenolu iegūšanas tehnoloģija no zaleņa ekstrakta neitrālās frakcijas, ekstrahējot ar polāro šķīdinātāju. Izstrādāta fosfolipīdu koncentrātu iegūšanas tehnoloģija no skujkoku zaleņa, kas satur 1,2 – 1,8 % fosfolipīdu, izmantojot ekstrakciju ar acetonu un izopropanolu. Pateicoties tam, ka skujkoku zalenis satur ievērojamu daudzumu proteīna (piem., priedes skujiņās proteīna saturs ir 8 – 14 %), kurā ir svarīgās aminoskābes, galvenokārt lizīns, ir izstrādātas olbaltumvielu un vitamīnu koncentrātu iegūšanas tehnoloģiskās shēmas [36].

1.2. Skuju biežais ekstrakta bioloģiski aktīvās vielas

Skuju biežais ekstrakts (SBE) satur priežu zaleņa ekstraktvielas, kuras iegūtas, ekstraģējot ar nepolāriem šķīdinātājiem, un atdalot ēterisko eļļu un ūdenī šķīstošos savienojumus. Visus ekstrakta ķīmiskos savienojumus var iedalīt divās lielās grupās: neitrālās vielas un brīvās skābes (skat. 1. pielikumu) [6, 59, 60].

SBE bioloģisko aktivitāti nosaka hlorofila atvasinājumu, karotinoīdu, taukos šķīstošo E un K vitamīnu, fitosterīnu, poliprenolu, skvalēna, nepiesātināto taukskābju u.c. bioloģiski aktīvo vielu komplekss. Literatūrā ir dati par hlorofila-karotīna pastas (skujkoku zaļo skuju kompleksa, *conifer green needle complex* – CGNC) BAV saturu (skat. 1. tabulā) [61].

Darba teorētiskajā daļā detalizēti apskatītas divas bioloģiski aktīvo vielu grupas: karotinoīdi un hlorofili, kuru īpašību izpēti ir eksperimentālās daļas rezultātu pamatā. Kaut gan jāņem vērā, ka SBE šie savienojumi atrodas kompleksā ar citām BAV, un tikai šo vielu komplekss nodrošina ekstrakta farmakoloģiskās īpašības un terapeitisko darbību organismā.

1. tabula. Hlorofila-karotīna pastas (CGNC) sastāvs

Komponents	Saturs
Nātrija hlorofilīns un citi hlorofila atvasinājumi	400 – 1600 mg / 100 ml
β -karotīns un citi karotinoīdi	20 – 120 mg / 100 ml
E vitamīns	30 – 50 mg / 100 ml
K grupas vitamīni	1,2 – 2 mg / 100 ml
Fitosterīni (g.k. β-sitosterīns)	1,5 – 2,9 %
Poliprenoli	0,46 – 1,2 %
Skvalēns	0,14 – 0,16 %
Minerālvielas	5 – 7 %
Taukskābju, sveķskābju, divbāzisku, okso- un oksiskābju nātrija sāļi	44 – 60 %
Vaski	5 – 8 %
Ēteriskā eļļa	1 – 1,2 %
Ūdens	līdz 100 %

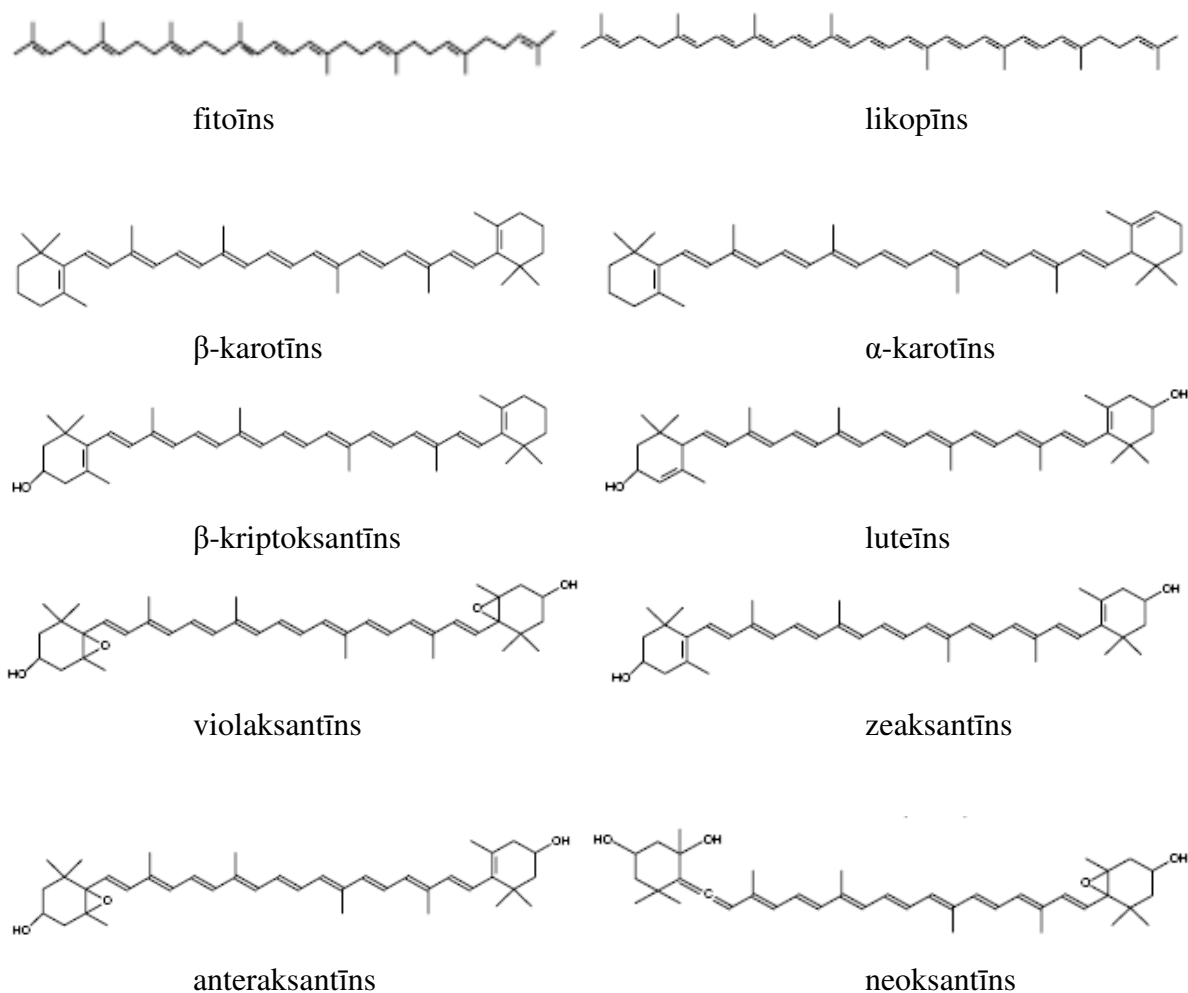
1.2.1. Karotinoīdi

Karotinoīdi pārstāv lielu dabā esošo pigmentu grupu, kurus sintezē augi, aļģes, sēnes, baktērijas [62–64] un pat viena kukaiņu suga [65]. Cilvēka un dzīvnieku organisms nespēj sintezēt karotinoīdus un saņem tos ar barību. Šobrīd dabā ir identificēti apmēram 750 karotinoīdi [66]. 1831. g. *Wackenroder* izolēja pigmentu no burkāniem, kuru nosauca par karotīnu (no latīņu v. *Daucus carota*) [67]. Šis pigments – β-karotīns – pārstāv pirmo lielo karotinoīdu grupu – karotīnus jeb ogļūdeņražu karotinoīdus. Otrā lielā karotinoīdu grupa, kuru 1837. g. atklāja *Berzelius* dzeltenajās rudens lapās un deva nosaukumu „ksantofili”, satur pamatā karotīnu ogļūdeņražu skeletu un papildus skābekļa atomus, parasti spirtu, aldehīdu, ketonu, epoksi- un/vai karboksil- funkcionālo grupu veidā [64, 67, 68]. 1931. g. *Karrer* ar līdzstrādniekiem atklāja β-karotīna un A vitamīna struktūru. 1939. g. *Wagner* ar līdzstrādniekiem atklāja, ka β-karotīna pārvēršanās A vitamīnā notiek zarnu gļotādā.

Karotinoīdi parasti ir C₄₀ tetraterpenoīdi, sastāv no astoņiem izoprēna fragmentiem. Karotinoīdu biosintēzes sākuma stadijās notiek C₅ ķēdes pagarināšanās līdz C₁₀ (geranilfosfāts), C₁₅ (farnezildifosfāts) un C₂₀ (geranil-geranildifosfāts), kura dimerizācijas rezultātā veidojas fitoīns, pirmais C₄₀ karotinoīds, aciklisks bezkrāsains savienojums, no kura veidojas C₄₀H₅₆ struktūra – likopīns, pirmais krāsainais karotinoīds ar garu poliēnu ķēdi, kurai ir konjugēto dubulto saišu sistēma, kas ir visu karotinoīdu pamatā. Ciklizācijas, hydrogenizācijas, dehydrogenizācijas, dubulto saišu migrācijas, oksidēšanās, izomerizācijas, ķēžu saīsināšanās vai pagarināšanās, pārkārtošanās un šo procesu kombināciju rezultātā veidojas dažādi karotinoīdi (skat. 1. att.) [66, 69–72]. Dabā karotinoīdi atrodas galvenokārt

stabilā *pilnīgi-trans* izomēru formā, bet eksistē arī *cis* izomēri. Konjugēto dubulto saišu sistēma darbojas kā gaismu absorbējošs hromofors un nodrošina karotinoīdiem brīnišķīgu krāsu no dzeltenās līdz sarkanai [62, 63, 66, 70, 73, 74].

Dabā izveidojas apmēram 100 milj. tonnu karotinoīdu gadā [71, 72], lielākā daļa no kuriem ir atrodama jūras aļģēs (fukoksantīns) un zaļajās lapās (luteīns, violaksantīns un neoksantīns). Augstākajos augos karotinoīdi atrodas plastīdās. Karotinoīdu sastāvs lapās ir vienāds visām sugām: β -karotīns (~25 – 30 %), luteīns (~45 %), violaksantīns (~15 %) un neoksantīns (~15 %) un nelielos daudzumos α -karotīns, α - un β -kriptoksantīns, zeaksantīns, anteraksantīns un luteīns-5,6-epoksīds. Lapās karotinoīdi ir neesterificētā veidā, pārējos audos arī esterificēti [66, 70, 71]. Augos karotinoīdi kopā ar hlorofiliem piedalās fotosintēzes procesā un aizsargā šūnas no fotooksidatīvās degradācijas [63, 64, 72].



1. attēls. Karotinoīdu ķīmiskā struktūra

Cilvēka asins plazmā un audos ir identificēti apmēram 20 karotinoīdi [66, 64], galvenie no kuriem ir α -karotīns, β -karotīns, likopīns, luteīns, β -kriptoksantīns un zeaksantīns [63, 65, 75]. Karotinoīdu koncentrācija plazmā ir $1 - 2 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ [65].

Karotinoīdi atrodas augu fotosintētiskajā aparātā (hloroplastos – zaļajās lapās), hromoplastos vai izšķīdināti eļļas pilienos (augļos), kā arī membrānās puskrīstālisko cieto daļiņu veidā (tomātos, burkānos) [76]. Tas, kādā veidā karotinoīdi atrodas pārtikā, ietekmē to absorbciju cilvēka organismā, piem., karotinoīdi labāk absorbējas no augļiem, nekā no dārzeņiem. Karotinoīdu *cis* izomēri absorbējas labāk, nekā *trans* izomēri, tāpēc pārtikas termiska apstrāde, kad no karotinoīdu *trans* izomēriem veidojas *cis* izomēri, veicina to uzsūkšanos [66].

Karotinoīdu absorbcija notiek vairākās stadijās, kuras iekļauj mikronizāciju un emulģēšanu kuņģa-zarnu traktā, uzsūkšanos tievajās zarnās, transportēšanu caur limfātisko sistēmu un vārta vēnu aknās, tālāk asinīs un izplatīšanos audos [66, 73, 75].

Karotinoīdi ir lipofilās vielas, tāpēc tie slikti uzsūcas bez emulģēšanās. Karotinoīdu, kā arī tauku emulģēšana notiek tievajās zarnās žults sāļu klātbūtnē, veidojot lipīdu micellas [45, 66, 75, 77]. Tauki, stimulējot žults sekrēciju un lipīdu micellu veidošanos, paaugstina karotinoīdu biopieejamību [65, 66, 77]. Biopieejamību negatīvi ietekmē vielas, kuras saista žults sāļus vai noārda micellu struktūru: alkohols, pektīni, šķiedrvielas. Karotinoīdu absorbcija ir traucēta arī žultsceļu un kuņģa-zarnu trakta slimību gadījumā [66, 77].

Absorbcijas efektivitāte samazinās, palielinoties karotinoīdu devai [65, 76, 77]. β -karotīna nepieciešamā diennakts deva ir $5 - 6 \text{ mg}$ [72, 77].

Zarnu gļotādā lielākā daļa karotinoīdu, kuriem piemīt A provitamīna aktivitāte, transformējas retinolā, tomēr ievērojama daļa (apm. 30 %) uzsūcas neizmainītā veidā, kaut gan karotinoīdi no zarnām absorbējas sliktāk nekā A vitamīns [65, 66].

Karotinoīdu absorbcija zarnu gļotādā nenotiek pasīvās difūzijas rezultātā, kā vēl nesen tika uzskatīts. Šis process notiek ar enterocītu palīdzību, kuri pārtransportē karotinoīdus plazmā. Karotinoīdi tiek pakoti hilomikronos, no kuriem hepatocīti tos inkorporē lipoproteīnos, kuri nonāk asinsritē [73, 75, 76, 78, 79]. Karotīni (β -karotīns, likopīns) pārsvarā koncentrējas zema blīvuma lipoproteīnos, bet vairāk polāri ksantofili (luteīns, zeaksantīns) – gan zema, gan augsta blīvuma lipoproteīnos [76].

Karotinoīdi uzkrājas aknās, aizkuņģa dziedzerī, nierēs, virsnierēs, sirdī, vairogdziedzerī, olnīcās, priekšdziedzerī, liesā, acs audos. Īpaši daudz karotinoīdu ir aknās un tauku šūnās [65, 66]. Tāpat kā asins plazmā, galvenie karotinoīdi audos arī ir α - un β -

karotīns, likopīns, luteīns, zeaksantīns un β -kriptoksantīns. Dažos audos akumulējas specifiski karotinoīdi un to izomēri. Tā, piem., acs makula akumulē lielā koncentrācijā luteīnu un zeaksantīnu [62, 76, 80], priekšdziedzera šūnas – likopīnu un tā izomērus [65, 66, 76], β -karotīns galvenokārt uzkrājas aknās, reproduktīvajos audos un virsnierēs [76].

Karotinoīdi ir galvenais un vienīgais drošais A vitamīna dabīgais avots [63, 65, 77]. Cilvēka un dzīvnieku organismā A vitamīns veidojas karotinoīdu fermentatīvā metabolisma (fermenta β -karotīn-15-15 dioksigenāzes darbības) rezultātā. Karotinoīdi nav toksiski, bet A vitamīna veidošanās no tiem ir enzimatiski limitēta [72, 79].

Tomēr ne visiem karotinoīdiem piemīt A provitamīna aktivitāte. Pēc struktūras A vitamīns (retinols) ir tieši puse no β -karotīna molekulas ar pievienotu ūdens molekulu laterālās poliēnu ķēdes galā. Tādējādi, β -karotīns ir potenciālais provitamīns A ar 100 % aktivitāti. Vitamīna A aktivitātes esamības minimums ir neaizvietotais β gredzens ar C_{11} poliēnu ķēdi. A provitamīna aktivitāte piemīt arī α - un γ -karotīnam, un β -kriptoksantīnam [63, 65, 66, 70, 72, 79].

Karotinoīdiem piemīt arī citas specifiskas īpašības, kuras nav saistītas ar A provitamīna aktivitāti.

Karotinoīdi pilda antioksidantu funkcijas, saistot singleto skābekli 1O_2 , kas veidojas fotoķīmiskajās reakcijās, lipīdu peroksīdus u.c. radikālus. Luteīns un zeaksantīns aizsargā fotoreceptorās šūnas no gaismas ģenerētiem skābekļa radikāliem, tādējādi aizkavējot makulāro deģenerāciju. Ar karotinoīdu (galvenokārt β -karotīna un likopīna) antioksidantu īpašībām daļēji saista arī to iespējamo protektīvo efektu pret sirds asinsvadu slimībām un vēzi [62, 63, 65, 66, 70, 73, 77, 78]. Pierādīta karotinoīdu ietekme uz vēža šūnu inhibēšanu *in vitro*, dzīvnieku modeļos un cilvēkiem plaušu, taisnās zarnas, krūts un priekšdziedzera vēža gadījumos [64, 73].

Tomēr noteiktos apstākļos karotinoīdi (t.sk. β -karotīns) var darboties arī kā pro-oksidanti [65, 66, 73, 80, 81]. Svarīgs faktors, kas nosaka karotinoīdu protektīvo efektu pret brīvajiem radikāliem, ir to polaritāte, no kuras, savukārt, ir atkarīga to atrašanās vieta un orientācija membrānās. Nepolārie β -karotīns un likopīns darbojas galvenokārt membrānas iekšējā hidrofoajā slānī, turpretī polārie ksantofili cīnās ar brīvajiem radikāliem membrānas ārējā daļā, kas saskaras ar ūdens fāzi [66, 81]. Lielās karotinoīdu koncentrācijās oksidatīvajos apstākļos var izpausties karotinoīdu pro-oksidatīvajā efektā [66, 73]. Ar šo efektu, iespējams, bija saistīti pētījumu rezultāti, kuros β -karotīns, lietots lielās devās ne tikai neuzrādīja

aizsardzību pret vēzi vai sirds asinsvadu slimībām, bet riska populācijā (smēķētājiem un azbesta strādniekiem) uzrādīja paaugstinātu vēža un sirds slimību risku [73, 80].

Izteiktāku antioksidantu aktivitāti karotinoīdi uzrāda darbojoties vairākiem karotinoīdiem maisījumā, vai arī kopā ar citiem antioksidantiem (tokoferoliem, askorbīnskābi) [64, 79].

Ir izteikts pieņēmums, ka karotinoīdu vēža inhibējošs efekts saistīts ar to spēju uzlabot starpsūnu kontaktus, palielinot transmembrānu proteīna koneksīna-43 ekspresiju. Īpaši aktīvi šajā procesā izrādījās β -karotīns, kantaksantīns un luteīns [63–65, 72, 73, 78].

Nesen veiktie pētījumi parādīja, ka karotinoīdu darbībai organismā var būt arī citi mehānismi, piem., šūnu augšanas regulācija, imūnās atbildes modulēšana, enzīmu aktivitātes, t.sk. citohroma-450 monooksigenāzes sistēmas modulēšana [63, 65, 72, 73, 78]. Karotinoīdi (luteīns un zeaksantīns), iespējams, var aizkavēt kataraktas attīstību [73].

1.2.2. Hlorofila atvasinājumi

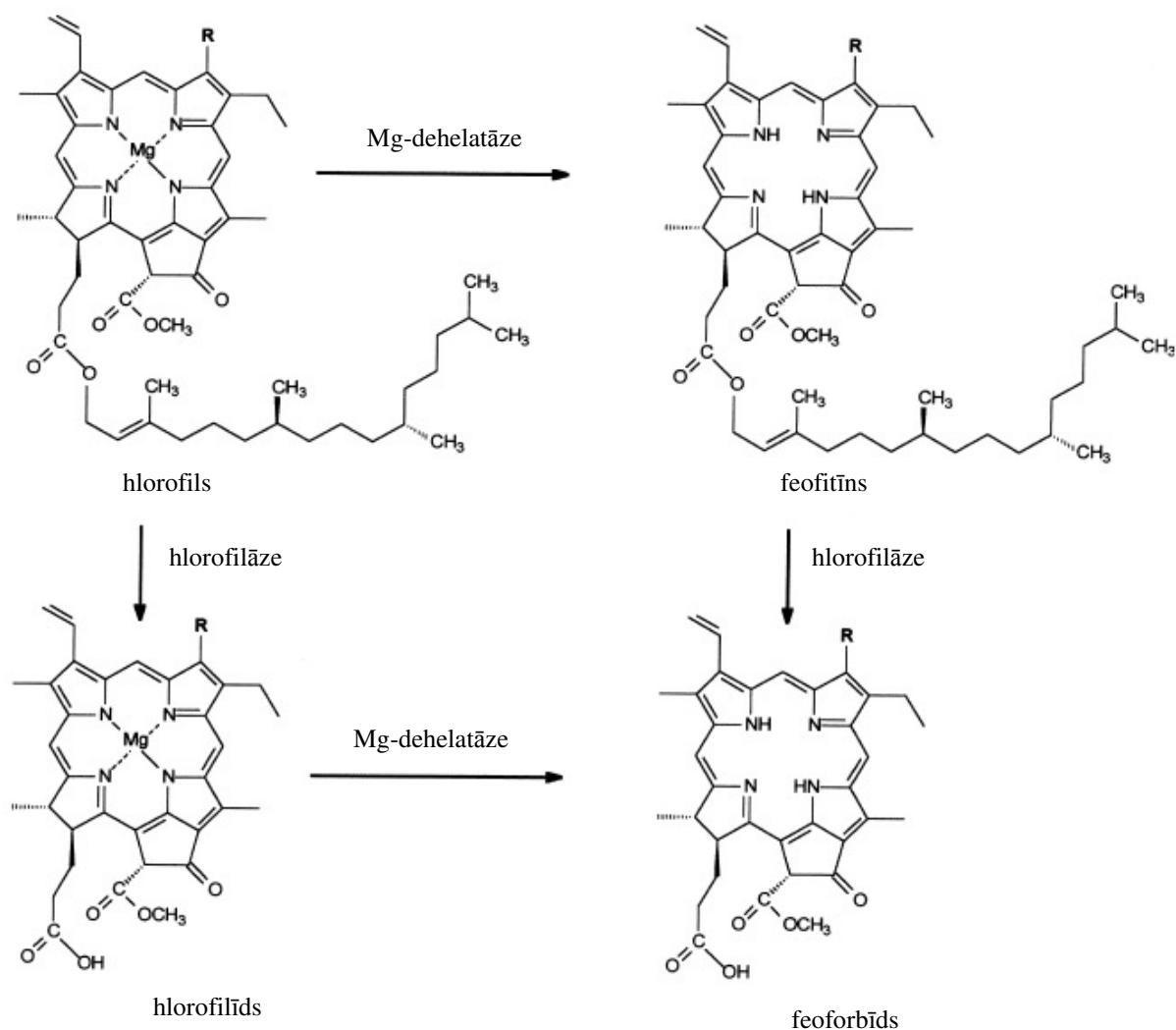
Hlorofils ir zaļais pigments, kas atrodas augu hloroplastos, aļģēs un ciānbaktērijās. Tā nosaukums nāk no grieķu valodas vārdiem $\chi\lambda\omega\rho\acute{o}\varsigma$ (*hloros*, “zaļš”) un $\phi\acute{\upsilon}\lambda\lambda\omicron\nu$ (*fillon*, “lapa”). Pirmo reizi hlorofilu izolēja *Pelletier* un *Caventou* 1818. g. Detalizētu hlorofila struktūru, t.sk. porfirīna gredzenu, atklāja *Fischer* ar līdzstrādniekiem 1937. g. [82]. 1960. g. *Woodward* publicēja pilnu hlorofila molekulas sintēzi. 1967. g. stereoķīmisko struktūru izskaidroja *Fleming*.

Pēc struktūras hlorofils ir ciklisks tetrapirols, kurā viens pirola gredzens ir reducēts. Struktūras centrā ir helatēts magnija jons. Hidrofila porfirīna makrocikla sānu ķēdes skābe ir esterificēta ar augsti hidrofobu diterpēnu spirtu – fitolu. Pašlaik ir zināmi apmēram 10 pigmenti, kuri ietilpst hlorofilu grupā un vairāk par 50 dažādas ar hlorofila struktūru saistītas molekulas [82].

Starp augiem dabā visplašāk ir izplatīts hlorofils *a*. To satur visi fotosintezējošie organismi, izņemot baktērijas. Zili-zaļās aļģes satur tikai hlorofilu *a*. Citas augu grupas satur papildus hlorofilus. Tā, piem., hlorofils *b* ir augstākajos augos un zaļajās aļģēs, bet hlorofili *c*, *d*, *e* un to atvasinājumi ir atrodami brūnajās aļģēs un diatomu sugās t.sk. brūnajās, sarkanajās un dzelten-zaļajās aļģēs [82]. Hlorofila *a* un *b* attiecība augstākajos augos ir 3 : 1 [83]. *Cucurbitaceae* iekšējais sēklu apvalks, kas ir zaļā krāsā, satur protohlorofilu, kuram pirola gredzens nav reducēts [82]. Fotosintezējošajās baktērijās ir t.s. bakteriohlorofili [83].

Hlorofiliem ir svarīga loma fotosintēzē, tie uztver saules gaismas enerģiju, kas tiek pārvērsta ķīmiskajā enerģijā. Pateicoties hlorofilu molekulā esošai konjugēto dubulto saišu poliēnu sistēmai, tie ir ļoti efektīvi fotoreceptori. Hlorofili absorbē gaismu zilajā un sarkanajā elektromagnētiskā spektra daļā [82].

Dabīgie hlorofili ir jutīgi pret pH izmaiņām un temperatūras paaugstināšanos, no tiem veidojas dažādi degradācijas produkti. Hlorofila sabrukšanas procesā vairākumā gadījumu hlorofils sākumā defitilējas līdz hlorofilīdam hlorofilāzes klātbūtnē un pēc tam ar Mg-dehelatāzes palīdzību nošķēlas centrālais Mg^{2+} jons. Atsevišķos gadījumos Mg^{2+} nošķelšanās no hlorofila notiek pirms defitilēšanas, veidojoties feofitīnam. Abu šo reakciju rezultātā veidojas feoforbīds – pēdējais zaļas krāsas katabolīts šajā procesā (skat. 2. att.) [84].



2. attēls. Hlorofilu un to defitilēto un demetalizēto atvasinājumu struktūras; hlorofilam *a* un tā atvasinājumiem $R = -CH_3$; hlorofilam *b* un tā atvasinājumiem $R = -CHO$ [84].

Feofitīnu un feoforbīdu veidošanos var novērot pēc krāsas pārmaiņām no spilgti zaļas uz olīvu zaļo vai olīvu dzelteni [83]. Feofitīni un feoforbīdi veido feopigmentus – lielo daļu dabas zaļo pigmentu [84].

Ja feofitīna molekulā centrālo vietu ieņem Zn^{2+} vai Cu^{2+} joni, savienojumi atgūst spilgti zaļo krāsu [83]. Metālu jonus saturošie hlorofilu atvasinājumi feofitināti labi šķīst taukos, etilspirtā un citos organiskos šķīdinātājos, bet slikti šķīst ūdenī. Labi šķīst ūdenī hlorofilu atvasinājumu nātrijs un kālijs sāļi – hlorofilīni.

Informācija par hlorofila savienojumu biopieejamību ir nepietiekama [83]. Pētījumos, kuros *in vitro* tiek imitēts gremošanas process kuņģī un tievajās zarnās, konstatēts, ka gremošanas procesa laikā dabīgie hlorofili pārvēršas feofitīna atvasinājumos. Efektīvāk notiek hlorofila *a* atvasinājumu micelarizācija, salīdzinot ar hlorofila *b* atvasinājumiem. Zarnu šūnas absorbē 5 – 10 % no micelarizēto hlorofila atvasinājumu [85]. Pagaidām nav zināms, kā dabīgie hlorofila atvasinājumi metabolizējas un/vai nonāk asinsritē [83].

Vairāk informācijas ir par hlorofila pussintētiskā atvasinājuma ūdenī šķīstošā nātrijs hlorofilīns, kas satur Cu^{2+} kā centrālo jonu, biopieejamību. Konstatēts, ka šā savienojuma atvasinājumi uzsūcas cilvēka organismā, tomēr absorbcija notiek selektīvi [83, 86, 87]. Ūdenī šķīstošie hlorofila atvasinājumi, t.sk. hlorīni, hlorofilīdi, feoforbīdi, ir stabili gremošanas procesa laikā un absorbējas zarnu gļotādā ar aktīvā transporta palīdzību. Daļa nonāk asinsritē, tomēr metabolisms nav zināms [83, 86].

Tomēr ir svarīgs pat neliels hlorofila atvasinājumu absorbcijas līmenis, ņemot vērā zaļo pigmentu lielus daudzumus, ko cilvēks saņem ar pārtiku [83].

Publicētie pētījumi liecina, ka augu pigmentiem, t.sk. hlorofiliem, ir liela nozīme cilvēka veselībā. Tiek plaši pētīti gan dabīgie hlorofili, gan to pussintētiskie atvasinājumi [83]. Hlorofila ķīmiskās struktūras līdzība ar asins hemoglobīnu ir pamatā tā preparātu plašai izmantošanai medicīnā kā hematoģenēzi stimulējošos līdzekļus. Tiem piemīt pretmikrobu un pretiekaisuma īpašības. Tie stimulē imūno atbildi un veicina čūlu, brūču un apdegumu ārstēšanu [61]. Hlorofili aizsargā DNS no kancerogēnu u.c. toksīnu bojājošas ietekmes [88].

Pēdējā laikā uzmanība tiek pievērsta hlorofila atvasinājumiem kā vēža hemoprolifakses līdzekļiem. Šie savienojumi ir uzrādījuši ievērojamu bioloģisko aktivitāti *in vitro* un *in vivo*, kas saistīta ar aizsardzību pret vēzi, t.sk. antioksidantu, antimutagēno aktivitāti, ksenobiotiķu metabolizējošo enzīmu modulāciju, vēža šūnu līniju apoptozes indukciju [87, 88]. Hlorofili bloķē kancerogēnēzes pirmo etapu (veselo šūnu pārvēršanos

vēža šūnās). Nesen veiktajos pētījumos parādīta taisnās zarnas vēža riska samazināšanās cilvēkiem, kuri lietojuši ar hlorofilu bagātu uzturu [83].

Hlorofila atvasinājumu vēža profilakses efekts tiek plaši pētīts, īpaši to *in vitro* antimutagēnā un antigenotoksiska aktivitāte pret atsevišķiem uztura un apkārtējās vides mutagēniem, tādiem kā heterocikliskie amīni, aflatoksīns, benzpirēni u.c. Dabīgie un pussintētiskie hlorofila atvasinājumi uzrādīja antigenotoksisku un antimutagēno aktivitāti baktēriju, kukaiņu un zīdītāju šūnās [83, 89].

Pētījumos *in vivo* ar dzīvnieku modeļiem (ādas, aknu, kolorektālais vēzis pelēm, žurkām, forelēm) galvenokārt ir pētīti ūdenī šķīstošie pussintētiskie hlorofila atvasinājumi, mazāk pētījumu ir ar dabīgiem hlorofila atvasinājumiem. Konstatēts, ka nātrija hlorofilīns modulēja aflatoksīna B1 inducēto hepatokanceroģenēzi forelēm, kavējot aflatoksīna saistīšanos ar DNS [83, 90]. Hlorofila atvasinājumi nodrošināja spēcīgu aizsardzību pret aflatoksīna B1 izraisītas kanceroģenēzes agrīniem bioķīmiskajiem un vēlīniem patofizioloģiskajiem biomarkšiem žurku aknās un taisnajā zarnā [91].

Paaugstināta hepatokarcinomas riska reģionā, kurā iedzīvotāji bija pakļauti ilgstošai aflatoksīna B1 iedarbībai, randomizētā dubultklā placebo kontrolētā pētījumā tika izmantoti trīs hlorofilīna 100 mg devu saturoši uztura bagātinātāji 4 mēnešu laikā. Konstatēta aflatoksīna līmeņa samazināšanās urīnā par 55 % [87, 88].

Atsevišķos pētījumos izskaidrots hlorofila atvasinājumu vēža hemoprofilakses mehānisms. *In vitro* un šūnu kultūrās veiktajos pētījumos ir pierādīta antioksidatīvā aktivitāte, mutagēnu saistīšana, ksenobiotiķu detoksikācijas modulēšana, kā arī apoptozes indukcija. Šie iedarbību veidi daļēji pamato hlorofila protektīvo iedarbību *in vivo* [83].

Kaut arī hlorofilu atvasinājumi bieži tiek uzskatīti par pro-oksidantiem, jo tie piedalās tauku un eļļu fotooksidācijā, tomēr gan hlorofilu atvasinājumi, gan feofitīni uzrāda aizsardzību pret eļļu auto-oksidēšanās procesiem tumsā [83]. Hlorofila atvasinājumi spēj reducēt brīvos radikālus, t.sk. peroksīdus, singleto skābekli $^1\text{O}_2$ u.c. [89, 92]. Hlorofila *a* atvasinājumi efektīvāk tver radikālus, salīdzinot ar hlorofila *b* atvasinājumiem. Metālu nesaturošie atvasinājumi, piem., hlorīns, feofitīns un pirofeofitīns uzrādīja ievērojami zemāku antiradikālu aktivitāti, salīdzinot ar metālu saturošiem atvasinājumiem, tādiem, kā Mg-hlorofili, Zn-feofitīni, Zn-pirofeofitīni, Cu-feofitīni un Cu-hlorofilīni [89]. Izmantojot žurku aknu mitohondrijas kā modeļsistēmu, hlorofilīna membrānu protektīvās īpašības ir pierādītas *in vitro* un *ex vivo* [93]. Hlorofilīna antioksidatīvās un radioprotektīvās īpašības ir pārbaudītas peļu liesas limfocītos, kur tas inhibēja lipīdu peroksidāciju un daļēji novērsa radiācijas

inducēto limfocītu apoptozi [94]. Ir parādīts porfirīnu, t.sk. hlorofilīna, inhibējošs efekts uz oksidatīvo DNS bojājumu un peļu ādas iekaisumu, kā pretaudzēju mehānisms [95].

Pārtikā esošo mutagēnu un kancerogēnu izolēšana ar starpnieku molekulām ir koncepcija, kura ir attiecināma uz atsevišķiem savienojumiem, tostarp arī hlorofiliem [83]. Savienojumi, kuri slikti absorbējas kuņģa-zarnu traktā, arī var būt fizioloģiski svarīgi dēļ to spējas mijiedarboties ar citām vielām kuņģa-zarnu traktā. Savienojumu veidošanās ar pārtikā esošiem mutagēniem un kancerogēniem, un šo toksisko vielu biopieejamības samazināšana parāda alternatīvo mehānismu, kā neabsorbējamie hlorofila atvasinājumi veic pretvēža aizsardzību [83]. Gan dabīgie hlorofila atvasinājumi, gan to šķīstošie analogi veido kompleksus ar pārtikā esošiem mutagēniem, t.sk. aflatoksīnu [83, 89, 96–98].

Vēl viens literatūrā aprakstītais hlorofila savienojumu darbības mehānisms ir saistīts ar endogeno ksenobiotiķu detoksikācijas sistēmas modulēšanu [83, 99].

Hlorofila atvasinājumi var darboties hemoprofilaktiski arī pateicoties apoptozes indukcijai pārveidotās šūnās un vēža šūnās. Tā, piem., nātrija hlorofilīns inducēja apoptozi cilvēka taisnās zarnas, aknu un krūts vēža šūnās [83].

1.2.3. Citi savienojumi

E vitamīna grupai pieder tokola un tokotrienola metil-atvasinājumi, kuriem piemīt α -tokoferola bioloģiskā aktivitāte: α -, β -, γ - un δ -tokoferols, un α -, β -, γ - un δ -tokotrienols [45, 100]. E vitamīns uzsūcas tievajās zarnās, uzsūkšanos veicina tauki un žults skābes [45]. E vitamīna savienojumu vidū d- α -tokoferolam ir vislielākā biopieejamība [100].

E vitamīns pilda organismā dažādas funkcijas, galvenā no kurām ir antioksidanta funkcija [45, 100, 101]. Tā ir nepieciešama šūnu membrānu stabilitātes saglabāšanai. E vitamīns piedalās proteīnu biosintēzē, audu elpošanas procesā, normalizē lipīdu vielmaiņu [45, 101]. E vitamīna tokotrienolu formām piemīt izteiktas hipoholesterīnēmiskas, pretvēža un neiroprotektīvas īpašības. Tokoferoliem piemīt pretiekaisuma, antineoplastiska un nātrijurētiska iedarbība. α -Tokoferols inhibē trombocītu agregāciju, šūnu proliferāciju, monocītu salipšanu, γ -tokoferolam piemīt lielāka protektīvā iedarbība dažu vēža tipu un miokarda infarkta gadījumā [100]. E vitamīnam ir svarīga loma organisma reproduktīvajā funkcijā un deģeneratīvo procesu aizkavēšanā [45, 101, 102].

K grupas vitamīni (naftohinoni) plaši izplatīti dabā un ir pārstāvēti ar divām hinonu grupām: filohinoni (K_1 vitamīni) un menahinoni (K_2 vitamīni). Filohinoni un to demetilētie atvasinājumi ir augos, menahinonus sintezē dažādas baktērijas, kā arī tie ir naftohinonu

transformācijas produkti organismā [45, 103]. Daudz K_1 vitamīna satur priežu un egļu skujuas [3]. Priežu skuļās ir $16 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, bet egļu skuļās – $9,6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ filohinona [45].

K grupas vitamīni uzsūcas tievajās zarnās. Dabīgiem K vitamīniem, kuriem ir lipofilas īpašības, ir nepieciešama žults skābju un pankreātiskās lipāzes klātbūtne. Uzsūcas no 10 līdz 80 % K vitamīna [45]. Darbības mehānisma pamatā ir K vitamīna loma glutamīnskābes atlikumu modifikācijā no K vitamīna atkarīgajos asins recēšanas faktoros. K vitamīna nepietiekamība izpaužas kā asins recēšanas faktoru (II, VII, IX, X) satura samazināšanās, izraisot hemorrāģijas, hematomas, deguna asiņošanu [45]. Ir atrasts, ka filohinoni uzrāda pretvēža aktivitāti vairākās šūnu līnijās (aknu, taisnās zarnas, plaušu, kuņģa, deguna un rīkles, krūts, mutes gļotādas vēža un leukēmijas). Arī atsevišķos klīniskos pētījumos parādīta K_1 vitamīna pretvēža aktivitāte [103]. Palielināta K_1 vitamīna lietošana ar pārtiku tiek saistīta ar sirds išēmiskas slimības riska samazināšanos [104, 105].

Fitosterīni – augu izcelsmes sterīni (β -sitosterīns, kampesterīns, stigmasterīns) pēc struktūras ir līdzīgi holesterīnam [106]. Augos un mikroorganismos ir arī ergosterīns, kas ir ergokalciferola (D_2 vitamīna) provitamīns [45].

Fitosterīni veicina β -lipoproteīdu un holesterīna līmeņa normalizēšanos asinīs. Fitosterīniem piemīt pretaterosklerotiska [107] un pretvēža aktivitāte [108, 109].

Fitosterīnu pretaterosklerotiska aktivitāte ir saistīta ar to spēju samazināt holesterīna uzsūkšanos zarnu traktā, kas samazina holesterīna un zema blīvuma lipoproteīdu līmeni asinīs [108, 110]. Ar uzturu saņemtie fitosterīni samazina sirds asinsvadu slimību risku par 20 – 25 % [110].

Epidemioloģiskie pētījumi parādīja palielināta fitosterīnu daudzuma uzturā saistību ar resnās zarnas, prostatas, krūts vēža [106], kuņģa vēža [111] un plaušu vēža [112] riska samazināšanos. Fitosterīnu pretvēža darbības mehānisms saistīts ar to ietekmi uz šūnu membrānas struktūru un šūnu signālu regulēšanu. Tie inhibē audzēju augšanu, inducē vēža šūnu apoptozi, stimulē imūno atbildi un normalizē holesterīna metabolismu [106].

Poliprenoli ir augu poliizoprēna spirti ar izoprēna vienību skaitu molekulā no 10 – 20, kuri atrodas augos, baktērijās, sēnēs un dzīvnieku organismos. Ļoti lielos daudzumos poliprenoli atrodas skujkoku skuļās [113–115]. Cilvēks prenolus daļēji saņem ar uzturu, bet to lielākā daļa veidojas organismā. No prenoliem aknās sintezējas doliholi – piesātinātie poliprenolu atvasinājumi. Doliholi ir visos svarīgākajos orgānos: aizkuņģa dziedzerī, smadzenēs, sirdī, nierēs, aknās, liesā u.c. audos. Doliholfosfāta ciklā ar dolihola palīdzību notiek šūnu membrānu glikolizācija, t.i., glikoproteīnu sintēze [116].

Poliprenoli ir mazmolekulārie bioregulatori, kuru darbības pamatā ir to membrānaktīvās īpašības. Tie veic kofermentu funkcijas kā membrānaktīvie hidrofilo daļiņu transporta dalībnieki polisaharīdu, glikoproteīdu, peptīdglikānu u.c. līdzīgu ogļhidrātus saturošu polimēru biosintēzes procesā [117] Poliprenoli atjauno olbaltumu – ogļhidrātu vielmaiņu, normalizē imūno funkciju, tiem piemīt pretčūlas efekts, aknu funkciju atjaunošanas, antioksidantu un pretaudzēju aktivitāte [117, 118, 119, 120].

Skvalēns ir triterpēns, C₃₀ poliprenols, kas satur 6 izoprēna atlikumus un ir holesterīna biosintēzes metabolīts. Skvalēns ir viena no svarīgākām BAV, kura regulē lipīdu un steroīdu vielmaiņu. Tam piemīt imūnstimulējoša, hipoholesterīnēmiska, hipolipidēmiska, antioksidanta, pretvēža un pretiekaisuma aktivitāte. Eksperimentālie un klīniskie pētījumi parādīja, ka skvalēns aizsargā ādas šūnas no peroksidācijas, piedalās ksenobiotiķu detoksikācijā, stimulē šūnu un nespecifisko imūno atbildi, samazina holesterīna un triglicerīdu līmeni asinīs [121]. Pētījumi ar dzīvniekiem parādīja, ka skvalēns inhibē resnās zarnas, plaušu un ādas kancerogēnēzi [122].

Skuju biezajam ekstraktam piemīt fitoncīdu aktivitāte, kuru nodrošina sveķskābes un ēteriskā eļļa [3, 41, 40, 123].

1.2.4. Skuju biezā ekstrakta preklīniskā un klīniskā izpēte

Preklīniskajos pētījumos noskaidrots, ka SBE piemīt gastroprotektīvā iedarbība un reparatīvā iedarbība uz eksperimentālām kuņģa čūlām, baktericīda iedarbība uz grampozitīvo mikrofloru un gramnegatīvām baktērijām *Pseudomonas aeruginosae*, antioksidatīva un vāja imūnmodulējoša darbība.

Pētīta SBE gastroprotektīvā un reparatīvā īpašība un darbības mehānisms [17–19]. Eksperimentālajos pētījumos tika izmantotas modelētās patoloģijas metodes, kas pēc izcelsmes mehānisma ir iespējami tuvas čūlas klīnisko formu etioloģijai un patoģenēzei. Pētījumos tika izmantotas kuņģa čūlas trīs eksperimentālie modeļi: akūtā neirodistrofiska čūla [19], akūtā indometacīna čūla [18, 19] un hroniska acetāta čūla [17–19]. Gastroprotektīvā un reparatīvā aktivitāte tika salīdzināta ar smiltsērķšķa eļļas iedarbību.

Pētījumu rezultātā konstatēts, ka skuju ekstrakts samazināja čūlas bojājumu skaitu 6,5 reizes, tajā pašā laikā smiltsērķšķa eļļa – 1,6 reizes. Tādējādi, skuju ekstrakta pretčūlu aktivitāte bija 4 reizes lielāka, nekā smiltsērķšķa eļļas aktivitāte [19]. Šis fakts liecina par skuju ekstrakta izteiktu adaptogēno efektu, kas izpaužas pirmkārt kuņģa gļotādas aizsardzībā no čūlas bojājuma un ir saskaņā ar tā neirotropo iedarbību.

Akūtās čūlas gadījumā histoloģiskie pētījumi parādīja, ka 10. ārstēšanas dienā ar SBE izteikti samazinājās kuņģa gļotādas tūska un hiperēmija, izzuda gastrīta parādības, bet ārstēšanas kursa beigās samazinājās destrukciju daudzums.

Hroniskas kuņģa čūlas gadījumā samazinājās nekrozes zona. 20. dienā 25 % gadījumu notika pilna čūlas epitelizācija. Skuju ekstrakta iedarbības rezultātā izteikti samazinājās absolūtais perforāciju skaits, lielu daudzkameru cistu skaits, strutaino abscesu skaits, samazinājās masveida leukocītu sabrukšana nekrozes rezultātā, samazinājās bojājuma zonas mikrobu kontaminācija [19], ko var izskaidrot ar SBE antibakteriālo iedarbību [18], kā arī ar tā imūnmodulējošām īpašībām [21]. Čūlas indekss 20. terapijas dienā samazinājās ārstēšanas rezultātā ar SBE un smiltsērķšķu eļļu respektīvi 3 un 3,4 reizes, t.i. skuju ekstrakts un smiltsērķšķu eļļa dod labu terapeitisku efektu un veicina čūlu ātrāku dzīšanu [19].

Pētīta arī ekstrakta iedarbība uz skābi veidojošu un fermentus veidojošu kuņģa funkciju, antihipoksiska un antieksudatīvā aktivitāte. Konstatēts, ka SBE neietekmēja kuņģa sekretoro funkciju, kā arī nepagarināja dzīvnieku dzīves ilgumu hipoksijas apstākļos, t.i. tam nepiemīt antihipoksiskas īpašības, kā arī tas neietekmēja formālīna izraisīto iekaisuma eksudatīvo fāzi [19].

Pamatojoties uz iegūtiem rezultātiem, secināts, ka SBE uzrāda izteiktu aizsardzību uz neirodistrofisko kuņģa čūlu veidošanos žurkām. Tā reparatīvā iedarbība ir salīdzināma ar smiltsērķšķa eļļas efektu, bet atšķiras atkarībā no čūlas bojājuma modeļa (indometacīna vai acetāta). SBE priekšrocība ir tā labvēlīgā ietekme uz pēcoperāciju procesa gaitu, komplikāciju skaita samazināšanās, masīvas leukocītu bojāejas nekrozes dēļ novēršana, inficēšanās riska samazināšanās nekrozes zonā [17–19].

Pētot SBE baktericīdās īpašības, konstatēts, ka tas baktericīdi iedarbojas uz grampozitīvo floru un gramnegatīvām baktērijām *Pseudomonas aeruginosa*. SBE neiedarbojas uz gramnegatīvām baktērijām *Escherichia coli* un uz *Candida albicans* [18, 19].

SBE antioksidatīvo īpašību izvērtēšanai, pētīta skujkoku zaļās masas pārstrādes produktu, t.sk. SBE iedarbība uz žults oksidāciju *in vitro*, jo hroniska holecistīta uzliesmojuma gadījumā paaugstinās lipīdu peroksidācijas aktivitāte, žultspūslī uzkrājas daudz lipīdu peroksidācijas produktu, kas nelabvēlīgi iedarbojas uz tā gļotādu. Veikta žults oksidācijas īpašību noteikšana pēc metilēnzilā, jo cilvēka žultī atrodama metilēnzilā leikoforma un hromogēns. Iegūtie rezultāti, izmantojot metilēnzilo žults oksidācijas noteikšanai, pārliecinoši pierādīja, ka SBE piemīt antioksidanta īpašības jau mazās devās, kuras pieaug, palielinot vielas devu. SBE inhibējošā darbība nerodas tūlīt pēc pievienošanas,

bet gan inkubācijas procesā, īpaši izteikti 2 – 3 stundas pēc inkubācijas sākuma, kas liecina, ka SBE komponenti iesaistās oksidācijā. Turklāt, ilga inkubācijas perioda gadījumā noris liela hromogēna daudzuma atjaunošana leikoformā. Veicot lipīdu peroksidācijas produktu noteikšanu ar 2-tiobarbitūrskābi, konstatēts, ka 2-tiobarbitūrskābe uzkrājas, inkubējot SBE, kas liecina, ka SBE satur lipīdus un notiek to oksidācija. Vienlaikus ekstraktam piemīt spēja inhibēt skābekļa aktīvo formu veidošanos [20].

SBE nav kairinošas, alerģizējošas iedarbības, kancerogēnu, teratogēnu un mutagēnu īpašību [16] un tas nav toksisks siltasiņu dzīvniekiem: ievadot ekstraktu perorāli baltām bezsugas pelēm devā vairāk kā $10\,000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, LD_{50} nebija atrasta [18].

SBE klīniskā izpēte parādīja, ka preparāts ir labi panesams, neskatoties uz tā specifiskām organoleptiskām īpašībām, galvenās blaknes saistītas ar alerģisku reakciju uz skuju produktiem un lokālu ezofagogastroduodenālā apvidus kairinājumu un zāļu pārdozēšanu. SBE ir gļotādas aizsargfaktoru stimulators kuņģī un divpadsmitpirkstu zarnā. Tā darbības mehānisms saistīts ar sanoģenētisko procesu aktivēšanu (mikrocirkulācijas uzlabošanu, gļotu sekrēcijas stimulāciju) kuņģa un divpadsmitpirkstu zarnas gļotādā. Indikācijas SBE lietošanai ir hronisks aktīvs gastrīts (pārsvarā B tipa), palīgterapija hroniskas gastroduodenālas čūlas un aktīva gastrīta gadījumā, ulceroza un neulceroza dispepsija [16].

Pētījumā, kurā piedalījās Černobiļas AES avārijas seku likvidatori, novērtēts lipīdperoksidācijas process un antioksidantas sistēmas stāvoklis pacientiem ar pērcradiācijas sindromu, izpētīta SBE panesamība, efektivitāte un antioksidanta īpašības. Pirms un pēc ārstēšanas noteica antioksidanto fermentu aktivitāti, lipīdperoksidācijas intensitāti, Ca-ATFāzes aktivitāti, dolihola ekskrecijas līmeni urīnā. Noskaidrots, ka pēc ārstēšanas kursa pamatgrupā lipīdperoksidācijas intensitātes rādītāji pārliecinoši samazinājās, glutathionperoksidāze plazmā, Ca-ATFāzes aktivitāte un dolihola ekskrecija normalizējās, bet glutathionperoksidāze eritrocītos un katalāzes aktivitāte praktiski neizmainījās [22].

Hlorofila-karotīna pastas (skujkoku zaļo skuju kompleksa, CGNC) plaši preklīniskie un klīniskie pētījumi veikti Krievijā, kur pierādīta šā aktīvā kompleksa adaptogēnās un imūnstimulējošās īpašības, asinsrades īpašības, antioksidanta, reģenerāciju stimulējoša, anti-aterosklerotiska, pretmikrobu un pretvēža aktivitāte [61].

1.3. Dozētas formas izstrāde

Dozētas formas izstrādes galvenais mērķis ir panākt aktīvās vielas prognozējamu terapeitisko iedarbību tādā kompozīcijā, kuru ir iespējams ražot rūpnieciski ar atkārtojamu produkta kvalitāti. Šim nolūkam ir nepieciešams nodrošināt farmaceitiskā produkta ķīmisko, fizikālo un mikrobioloģisko stabilitāti, dozēšanas viendabīgumu, lietošanas ērtumu, piemērotu iepakojumu [23]. Dozētai formai ir jābūt efektīvai, stabilai un drošai lietošanā.

Izstrādājot dozētu formu, ir jāņem vērā sekojoši faktori:

1. Biofarmaceitiskie faktori, kuri ietekmē aktīvās vielas absorbciju, izmantojot dozētas formas dažādus ievadīšanas veidus.
2. Aktīvās vielas fizikālās un ķīmiskās īpašības.
3. Terapeitiskie faktori, kuri ietver klīniskās indikācijas un pacienta attieksmi [23].

Perorāla lietošana ir viens no visplašāk izmantojamiem aktīvo vielu ievadīšanas veidiem, jo tas ir visvienkāršākais, ērtākais un drošākais ievadīšanas veids. Populārākās perorālās dozētās formas ir tabletes, kapsulas, suspensijas, šķīdumi un emulsijas [23].

Stabila un efektīva farmaceitiska produkta iegūšanai ir svarīgi izpētīt aktīvās vielas fizikālās un ķīmiskās īpašības, tās saderību ar palīgvielām, stabilitāti dozētas formas ražošanas, transportēšanas, uzglabāšanas un lietošanas laikā [23, 124, 125].

Svarīgs faktors ir dozētas formas lietošanas ērtums. Daudzām aktīvām vielām, kuras paredzētas perorālai lietošanai, piemīt nepatīkamas organoleptiskas īpašības. Šādām vielām īpaši piemērota ir kapsulēta forma, kas nodrošina arī precīzu aktīvo vielu dozēšanu [23].

1.3.1. Perorāla dozēta forma – kapsula

Vārds „kapsula” ir cēlies no latīņu valodas vārda *capsula*, kas nozīmē „neliela kastīte, kārbīša, kontainers” [126, 127]. Kapsula ir gatava dozēta forma, kura sastāv no dažādas formas un tilpuma cieta vai elastīga apvalka, un cieta, šķidra vai pastveida konsistences pildījuma. Kapsulas parasti satur vienu aktīvās vielas devu [128].

Mīkstās želatīna kapsulas izgudrotas 1834. g. Francijā. Aptiekāri *Mothes* un *Dublanc* izmantoja ādas maisījumus, pildītus ar dzīvsudrabu, kurus iemērcā želatīna šķīdumā, atdzesēja, izlēja dzīvsudrabu no ādas maisījuma un noņēma želatīna apvalku, kuru piepildīja ar zālēm un aizkausēja. Metāla formas sāka izmantot 1846. g. *Giraud*. Kapsulas gatavoja ar formu iemērkšanu želatīna šķīdumā. Mūsdienu iekārtai līdzīgu mīksto kapsulu ražošanas mašīnu ar rotējošām presformām izgudroja *Scherer* 1933. g. (patentēja 1934. g.) un nepārtraukti

uzlaboja [126, 129–131]. Pilināšanas metodi mīksto kapsulu iegūšanai ražošanā ieviesa pagājušā gadsimta 60-jos gados Holandē [132, 133].

Cietās želatīna kapsulas izgudrotas 1847 g. vienlaikus Francijā – *Lehuby* un Anglijā – *Murdock. Hubel* 1877. g. izgudroja kapsulu automātu. 1931. g. *Colton* patentēja mašīnu cieto kapsulu ražošanai, kuras princips ir mūsdienu mašīnu pamatā [126, 134].

Kapsulai kā dozētai formai ir vairākas priekšrocības, salīdzinot ar citām perorālām formām, t.sk. tabletēm [24, 135–137]. Kapsulētiem preparātiem ir liela dozēšanas precizitāte ($\pm 1 - 3 \%$) un ražība [135]. Atkarībā no izmantojamās aparatūras, pildīšanas metodes, pildījuma raksturojuma un dozējuma modernie automāti ļauj iegūt līdz 120 tūkst. kapsulu stundā [138]. Ražojot kapsulas, aktīvās vielas retāk tiek pakļautas granulēšanai un presēšanai [139]. Kapsulu veidā var tikt uzlabota aktīvo vielu stabilitāte, jo pildījums ir cieši ietverts apvalkā un tādējādi aktīvās vielas ir pasargātas no gaismas, gaisa, mitruma iedarbības [139, 140]. Kapsulas maskē vielu nepatīkamo smaržu un garšu, tās ir viegli norijamas, kas ir svarīgs faktors, īpaši vecāka gadagājuma cilvēkiem, kā arī bērniem, ja ir rīšanas traucējumi [127]. Kapsulām ir estētisks izskats; uz kapsulas virsmas var uznest papildinformāciju, kā arī ir iespējams kombinēt divas krāsas [141], mīkstām kapsulām pat vairākas krāsas un zīmējumus [142]. Kapsulas viegli uzbriest, sairst, izšķīst un uzsūcas kuņģa-zarnu traktā. Aktīvās vielas farmakoloģiskā darbība sākas jau pēc 4 – 5 min (parastām kapsulām), jo kapsulas apvalks bieži vien sairst ātrāk, nekā tabletes vai dražejas, un šķidrums vai nesapresēts pildījums ātrāk un vieglāk absorbējas organismā [24, 135, 136]. Daudziem preparātiem kapsulās ir augstāka biopieejamība, salīdzinot ar tabletēm, jo želatīna kapsulas viegli šķīst bioloģiskajos šķīdumos, atbrīvojot aktīvās vielas, kuras var būt ne tikai cietā, bet arī šķīduma, mikroemulsijas vai suspensijas formā, kas paātrina uzsūkšanos [23]. Īpaši tas attiecas uz aktīvām vielām, kurām ir slikta šķīdība ūdenī. Šādas vielas iestrādā šķidrās konsistences kompozīcijās, kuras pilda cietajās vai mīkstajās kapsulās [139]. Izveidojot kapsulēto formu, ir nepieciešams mazāk palīgvielu, salīdzinot ar tabletēm un apvalkotām tabletēm [25, 137]. Kapsulās var pildīt savstarpēji nesaderīgās vielas, atdalot vienu no otras ar apvalkiem, mikrokapsulām, ievietojot kapsulās tabletes u.c. [141, 143]. Ar kapsulu palīdzību var regulēt aktīvās vielas atbrīvošanās vietu, ātrumu un laiku, iestrādājot noteiktas palīgvielas apvalkā, pildījumā, vai abos, un izmantojot speciālus tehnoloģiskus paņēmienus [25]. Izveidotas ātri sairstošas cietās kapsulas, kuras paredzēts lietot mutes dobumā [144]. Zāles kapsulu formā bieži vien tiek izmantotas pirmās stadijas klīniskajiem pētījumiem [135]. Kapsulas ir salīdzinoši grūtāk viltot [139].

Kapsulu negatīvās īpašības: kapsulas ir higroskopiskas (galvenokārt želatīna dēļ), tām jānodrošina optimālie uzglabāšanas apstākļi [145]. Želatīns ir mikroorganismu vairošanās vide, tāpēc kapsulu apvalka masai parasti pievieno konservantus [145, 146]. Kapsulās nevar pildīt vielas, kuras reaģē ar kapsulas apvalka materiālu, želatīnu, glicerīnu u.c., un kuras šķīdina, deformē apvalku (piem., ūdens vai spirta šķīdumus lielā daudzumā), šajos gadījumos izmanto īpašus tehnoloģiskus paņēmienus: higroskopisku vielu pievienošanu kapsulas saturam (pektīns, glikozes, maltozes sīrups, u.c.), daļēju vai pilnīgu glicerīna aizvietošanu ar sorbītu, polietilēnglikoliem, to esteriem [147].

Visi minētie fakti, kā arī ekonomiskie aspekti pamato kapsulu kā dozētas formas priekšrocības un lietošanas pieaugumu farmaceitiskajā jomā [141, 148].

Kapsulu veidi. Kapsulas iedala cietajās kapsulās un mīkstajās kapsulās.

Cietām kapsulām ir cilindriska forma ar pussfēriskiem galiem. Apvalks ir ciets, sastāv no divām daļām: kapsulas korpusa un kapsulas vāciņa, sienīņu biezums 0,1 – 0,12 mm. Mitruma saturs kapsulas apvalkā 13 – 16 %. Kapsulas ir 8 pamatizmēru un nestandarta izmēra kapsulas. Cietām kapsulām ir speciāla noslēgšanas sistēma [127, 128, 139, 141, 149, 150].

Mīkstās kapsulas ir dozēta forma, kas sastāv no elastīga apvalka un parasti pussšķidra vai šķidra pildījuma. Mīkstās kapsulas var būt dažādas formas un dažāda pildījuma tilpuma – līdz pat 20 ml. Mīkstām kapsulām sienīņas biezākas – 0,5 – 0,6 mm, mitrums no 5 – 8 % līdz 8 – 10 % [24, 25, 128, 136, 139]. Mīkstās kapsulas iegūst vienā procesā: iekārtā vienlaicīgi notiek gan kapsulu apvalka iegūšana, gan kapsulu pildīšana. Mīkstās kapsulas var būt ar šuvi, dažādas formas un divkrāsainas (iegūst ar presēšanas metodi), un bez šuves – pērles, sfēriskas formas, vienkrāsainas (iegūst ar pilināšanas metodi) [138].

1.3.1.1. Izejvielas kapsulu pagatavošanai

Kapsulu masas galvenās sastāvdaļas ir kapsulas sienīņas plēvi veidojoša viela, plastifikators un ūdens [151].

Plēvi veidojoša viela – polimērs:

Želatīns (liellopu, cūku, zivju, putnu) – izmanto cieto un mīksto kapsulu pagatavošanai [145, 147, 152–154].

Hidroksipropilmetilceluloze (hipromeloze, HPMC) – izmanto cietām kapsulām, ķīmiski stabils savienojums, nav jāpievieno konservanti, pateicoties zemam mitruma saturam var tikt izmantots higroskopisko vielu pildīšanai [145, 147, 155].

Polisaharīdi: pululāns – ūdenī šķīstošs polisaharīds, kuru iegūst no kukurūzas bakteriālās fermentācijas (*Aureobasidium pullulans*) rezultātā [156], termoplastiska ciete, kuru iegūst no kartupeļu cietes ķīmiskas modifikācijas procesā vai no *Tapioca* cietes, – izmanto cietām un mīkstām kapsulām [151, 157]. Alginātus (nātrija algināts, propilēnglikola algināts), gelāna gumijvielu (ekstracelulāru, lineāru anjonu polisaharīdu, kuru producē baktērija *Pseudomonas elodea*), karagenānu, mannāna gumijvielu – izmanto kā papildvielas kombinācijā ar želatīnu, lai palielinātu gela elastību [151].

Plastifikatori – nodrošina kapsulas apvalka elastību. Kā plastifikatorus kapsulu masas sastāvā izmanto glicerīnu, sorbitolu, maltitolu, taukskābes, laktamīdu, acetamīdu, polietilēnglikolus [158]. Glicerīns ir efektīvs plastifikators mīkstajās kapsulās, kuras pildītas ar lipofilām kompozīcijām, jo želatīns un glicerīns ir ļoti saderīgi savā starpā [151]. Polietilēnglikoli samazina želatīna kapsulu trauslumu. Tos lieto, kad pildījums satur higroskopiskas vai pret mitrumu jūtīgas vielas [147]. Pievienojot apvalkam kā plastifikatoru 1,2-propilēnglikolu, ir iespējams iekapsulēt vielas, kuras šķīst 1,2-propilēnglikolā kā kapsulas pildījumā [159].

Plēvi veidojošas vielas un plastifikatora attiecība kapsulas masā ir atkarīga no tā, vai šī masa ir paredzēta cieto vai mīksto kapsulu gatavošanai, kā arī ar kādu metodi kapsulas tiks gatavotas.

Cieto kapsulu sastāvā ir vairāk plēvi veidojošas vielas, salīdzinot ar mīkstajām kapsulām, bet mazāk (līdz 0,3 %) vai vispār nav plastifikatora. Mitrums (ūdens saturs 13 – 16 %) izžāvētajās cietajās kapsulās kalpo par plastifikatoru. Ja mitruma saturs samazinās, kapsulas kļūst trauslas [147]. Želatīna saturs cieto kapsulu pagatavošanai paredzētā masā ir līdz 35 – 40 % [139].

Želatīna saturs mīksto kapsulu masas sastāvā ir apmēram 40 %. Ūdens pagatavotā masā sastāda 30 – 40 % [24, 139]. Mīksto kapsulu masas sastāvā plastifikatora saturs ir parasti 20 – 30 % [24, 127, 147]. Ja mīksto kapsulu masā plastifikatora daudzums ir virs 30 %, kapsulas pēc žāvēšanas būs pārāk mīkstas, elastīgas un lipīgas, ja mazāk par 20 % – pārāk trauslas un cietas; abos gadījumos kapsulas var plīst glabāšanas un lietošanas laikā [139].

Izžāvēto mīksto kapsulu sastāvā plastifikatora un želatīna attiecībai jābūt no 0,4 : 1 līdz 0,8 : 1, vadoties no pildījuma sastāva īpašībām un uzglabāšanas apstākļiem [139, 151]. Tā, piem., hidrofilo pildījumu gadījumā kapsulu masā jāpievieno vairāk plastifikatora, kompensējot iespējamo plastifikatora migrāciju no kapsulas apvalka pildījumā. Kapsulas,

kuras paredzēts uzglabāt karstā mitrā klimatā, jāveido ar mazāku plastifikatora daudzumu. Arī kapsulu izmērs ietekmē plastifikatora daudzumu tajās: lielākām kapsulām pievieno vairāk plastifikatora, lai tās varētu vieglāk norīt [151]. Mazākas glicerīna koncentrācijas rekomendē izmantot mīkstajās kapsulās, kuras pildījumā satur viegli oksidējošās vielas, jo skābekļa izspiešanās caur želatīna plēvē palielinās, pieaugot glicerīna saturam kapsulas apvalkā [160].

Konservanti: p-oksibenzoskābes metilesteris (nipagīns), p-oksibenzoskābes propilesteris (nipazols) līdz 0,2 %; sorbīnskābe, salicilskābe, benzoskābe līdz 1 % [147].

Krāsvielas kapsulu sastāvā var būt ļoti dažādas. Tiek izmantotas dabīgās krāsvielas: karmīnskābe, hlorofils, b-karotīns, kurkumīns; neorganiskie pigmenti: dzeltenais, sarkanais, melnais dzelzs oksīds, titāna dioksīds; organiskās krāsvielas. Necaurspīdīgo apvalku iegūšanai izmanto titāna dioksīdu, retāk alumīnija hidroksīdu vai kalcija karbonātu. Ar speciālām tintēm uz kapsulām var izdarīt uzrakstus melnā un baltā krāsā [150, 151].

Želatīna masu gatavo apsildāmos reaktoros ar iepriekšējo želatīna uzbriedināšanu vai bez uzbriedināšanas, šķīdinot želatīnu sagatavotajā ūdens un plastifikatora maisījumā 60 – 80 °C temperatūrā, noteiktā secībā pievienojot visus komponentus. Pagatavoto masu vakuumē, lai atbrīvotu to no gaisa, un termostātē, lai nodrošinātu optimālo viskozitāti. Tas ir želatīna masas kvalitātes galvenais rādītājs, kas nodrošina optimālās struktūrmehāniskās īpašības un kapsulu sienīņu biezumu [24, 138, 139].

1.3.1.1.1. Želatīns

Želatīna izmantošanas kapsulu gatavošanai pamatā ir tā ūdens šķīdumu spēja atdziestot veidot blīvu gelu. Želatīns ir galvenais komponents, no kura tradicionāli veido kapsulas. Cēlonis tam ir želatīnam piemītošas īpašības: želatīns nav toksisks, to lieto pārtikā, un tas ir pieejams izejmateriāls; želatīns ir šķīstošs bioloģiskajos šķīdumos ķermeņa temperatūrā; tas ir labs formējošs materiāls izturīga, elastīga apvalka veidošanai; želatīna šķīdumam ir izcilas reoloģiskas īpašības paaugstinātā temperatūrā (45 – 50 °C); pāreja no sola gela stāvoklī notiek samērā zemā temperatūrā (35 – 40 °C) [127, 139, 145].

Želatīns ir kolagēna daļējās hidrolīzes produkts. Kolagēnu satur dzīvnieku āda, baltie saistaudi, kauli u.c. Skābes vai sārmī šķeļ kolagēnu dažāda garuma nesazarotās aminoskābju ķēdēs – želatīnā. Atkarībā no ķēdes garuma želatīnam var būt dažāda molekulmasa no 20 000 līdz 200 000 Da. Želatīna molekulas pamatā ir polipeptīdu ķēde no 18 aminoskābēm, tas satur līdz 30 % glicīnu, kā arī g.k. alanīnu, prolīnu, hidroksiprolīnu, glutamīnu [145].

Želatīnu iegūst, izmantojot divas metodes: skābju un sārmu metodi. Hidrolīzes paņēmiens nosaka galaprodukta dabu. A tipa želatīns – skābais, to iegūst ar daļēju skābo hidrolīzi no cūku ādas, apstrādājot to ar skābi (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄) pie pH 1 – 3 apmēram 1 diennakti (izoelektriskais punkts pie pH 6 – 9,5). B tipa želatīns – sārmains, to iegūst ar daļēju sārmaino hidrolīzi no demineralizētiem liellopu kauliem, apstrādājot tos ar kalcija hidroksīdu 1 – 3 mēnešus (izoelektriskais punkts pie pH 4,7 – 5,6), vai kolagēna fermentatīvo hidrolīzi [128, 139]. A un B tipa želatīns atšķiras pēc fizikāli-ķīmiskām īpašībām. Parasti izmanto abu tipu maisījumu, tas ļauj gatavot želatīna masu ar optimālām reoloģiskām īpašībām (gela stiprumu, viskozitāti, pH u.c.). Lielāka stipruma un viskozitātes gelu iegūst no A tipa želatīna [128, 145].

Želatīnam ir iedzeltena vai viegli brūngana krāsa [128]. Tas ir pieejams smalka pulvera, rupja pulvera, gabalu vai lokšņu veidā. Želatīns ir stabils sausā gaisā, bet mitrā gaisā pakļauts mikrobu vairošanās procesam. Vienīgais būtiskais želatīna trūkums ir augsta jutība pret mitrumu. Tas padara neiespējamu kapsulu pildīšanu ar vielām, kuras šķīdina želatīna apvalku, ka arī prasa noteiktus apstākļus glabāšanas laikā [145].

Vēl viena problēma, kas saistīta ar želatīna kā kapsulu izejvielas izmantošanu, ir liellopu trakumsērga, kura pirmo reizi konstatēta Lielbritānijā 1986. gadā [161]. Šo infekciju – transmitīvo spongiformo encefalopātiju (BSE – *Bovine Spongiform Encephalopathy*, TSE – *Transmissible Spongiform Encephalopathy*) izraisa DNS nesaturoša olbaltumviela ar zemu molekulas masu – prions (no angļu valodas – *proteinaceous infectious particles* – „prion”) [162]. Saistībā ar šo faktu uzstādītas stingrākas prasības attiecībā uz želatīna iegūšanu un kvalitātes kontroli atbilstoši Eiropas Savienības likumdošanai [128, 163]. Šajā sakarā tiek pētītas iespējas par želatīna izejvielu izmantot zivju ādu un mājputnu kaulus [128, 152–154].

1.3.1.2. Kapsulu pagatavošanas metodes

1.3.1.2.1. Iemērkšanas metode

Iemērkšanas metodi izmanto cieto kapsulu ražošanai un mīksto kapsulu gatavošanai laboratorijas apstākļos.

Iekārta, kuru izmanto cieto kapsulu pagatavošanai, sastāv no divām paralēlām platformu-turētāju rindām, katra platforma sastāv no vairākām cilindriskām ar noapaļotu galu metāla formām – stieņiem. Vienā rindā tiek gatavoti kapsulu vāciņi, otrā – paralēli – kapsulu korpusi. Vienā kapsulu mašīnā ir līdz 40 000 metāla formu, un tiek saražots apmēram 1 milj. kapsulu dienā [127]. Pirms lietošanas formas tiek ieziestas ar eļļu un atdzesētas līdz 22 °C

temperatūrai. Metāla formas tiek iegremdētas želatīna masā, kas atrodas termostatējamās vannās 45 – 55 °C temperatūrā. Tālāk formas tiek izņemtas no želatīna masas un platformas pagriežas ar formām uz augšu. Platformas ar formām nonāk žāvēšanas tunelī, kurā sākumā kapsulas žāvē ar siltu sausu gaisu, vēlāk temperatūra tiek samazināta līdz 22 °C, bet mitrums tiek palielināts tā, lai iegūtajās kapsulās mitruma saturs būtu 15 – 18 %, kas atvieglo kapsulu noņemšanu no formām. No žāvēšanas iekārtas platformas ar kapsulu formām nonāk automātiskajā ierīcē, kur kapsulas noteiktā garumā tiek nogrieztas, noņemtas no formām un padotas uz savienojuma bloku, kur kapsulu vāciņi savienojas ar korpusiem. Formas tiek attīrītas, ieziestas ar eļļu, un cikls atkārtojas. Tiek iegūtas cietās želatīna kapsulas ar sienību biezumu 0,10 – 0,12 mm un mitrumu 13 – 16 % (sausākas kapsulas ir trauslas, mitrākām kapsulām samazinās mehāniskā izturība). Kapsulas viegli savienojas, pateicoties speciālai noslēgšanas sistēmai – iedobītēm uz korpusa un vāciņa [127, 150].

1.3.1.2.2. Presēšanas metode

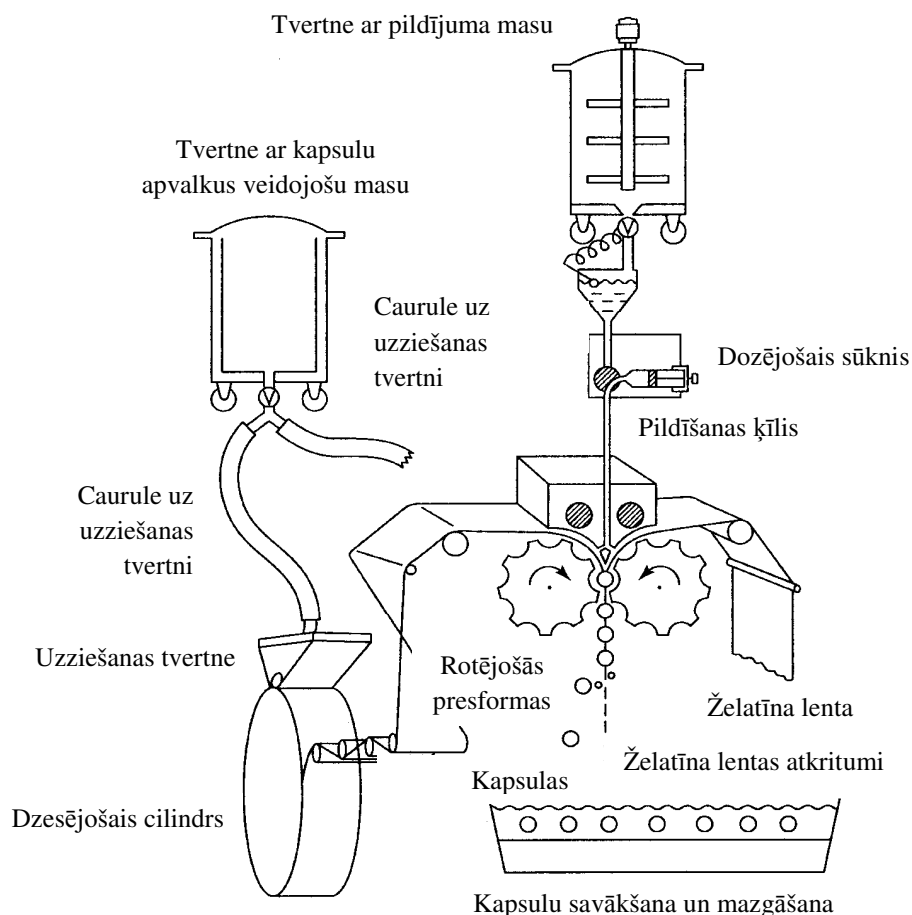
Presēšanas metodi izmanto mīksto kapsulu ražošanai, iegūst kapsulas dažādas formas un tilpuma ar šuvi. Mūsdienās izmanto rotējošo cilindrisko presformu metodi (*rotary die method*) [24, 138, 139]. Metodes priekšrocība – var veidot dažādas formas un izmēra kapsulas, tās var būt divkrāsainas. Metodes ražība – līdz 100 000 kapsulu stundā [138].

Mīksto želatīna kapsulu iegūšana ar rotējošo presformu metodi parādīta 3. attēlā. Želatīna masa tiek padota divās atsevišķās uzziēšanas tvertnēs, kuras izvietotas abās pusēs no iekapsulēšanas ierīces virs dzesēšanas cilindriem. Uz dzesēšanas cilindriem veidojas apvalka materiāla divas elastīgas lentas (katra apmēram 150 mm plata un 800 μm bieza). Lentas pēc ieziešanas no abām pusēm ar vazelīneļļu vai augu eļļu ar filca ruļļu palīdzību virzās virs pretējā virzienā rotējošiem valčiem, kuri sastāv no matricēm ar asām malām. Katras matricēs dobums pēc formas un izmēra atbilst veidojamās kapsulas pusei. Presformu temperatūra tiek uzturēta (36 – 39) °C robežās, tas nodrošina to, ka apvalka lentas ir pietiekami elastīgas, bet tomēr nekūst. Presformu valči ar noteiktu spēku saspiežas un rezultātā divas lentas sakausesējas un kapsulas tiek izgrieztas ar asām matricēs malām.

No sākuma aizkausējas kapsulas apakšējā daļa un sāni, veidojot maisam līdzīgu formu. Maiss tiek piepildīts ar pildījuma materiālu ar ķīļa palīdzību. Ķīlis var tikt apsildīts, lai uzlabotu aizkausēšanu. Pildījuma daudzums, ko ievada katrā kapsulā, tiek kontrolēts ar dozējošā sūkņa palīdzību ar precizitāti $\pm 1 - 3 \%$. Pildījums izpleš kapsulu, vienlaikus izspiežot no tās gaisu. Lai samazinātu skābekļa ietekmi uz vielām, kuras viegli oksidējas,

pildīšanas laikā izmanto slāpekli. Tālāk kapsula aizkausējas pilnīgi un atdalās no perforētas lentas.

Kapsulas pēc to virsmu attīrīšanas no eļļas ar organisku šķīdinātāju, nonāk rotējošos cilindriskos grozos, kur notiek primārā žāvēšana 20 – 30 °C temperatūrā. Šīs stadijas laikā no apvalkiem tiek atdalīts apmēram 50 % ūdens. Galīgā žāvēšana notiek tuneļu žāvētavās pie relatīvā gaisa mitruma 20 % vairākas dienas līdz pat 2 nedēļām, atkarībā no apvalka un pildījuma sastāva [138].



3. attēls. Rotējošo presformu metode (pēc *Fridrun Podczeck*, 2004) [138].

1.3.1.2.3. Pilināšanas metode

Pilienu veidošanas metode (pilināšanas metode) – samērā jauna metode, ieviesta ražošanā 20. gs 60-os gados Holandē, kur tika izgudrots automāts Globex Mark II, tāpēc daži autori šo metodi sauc par Globex metodi [132, 133], lai gan metodes pirmsākumi meklējami arī *Scherer* darbos (1943. g. patents) [164]. Pašlaik ražošanā izmanto automātu Globex Mark III. Ar šo metodi var iegūt maza tilpuma mīksta bezšuvju kapsulas stingri sfēriskas formas [151].

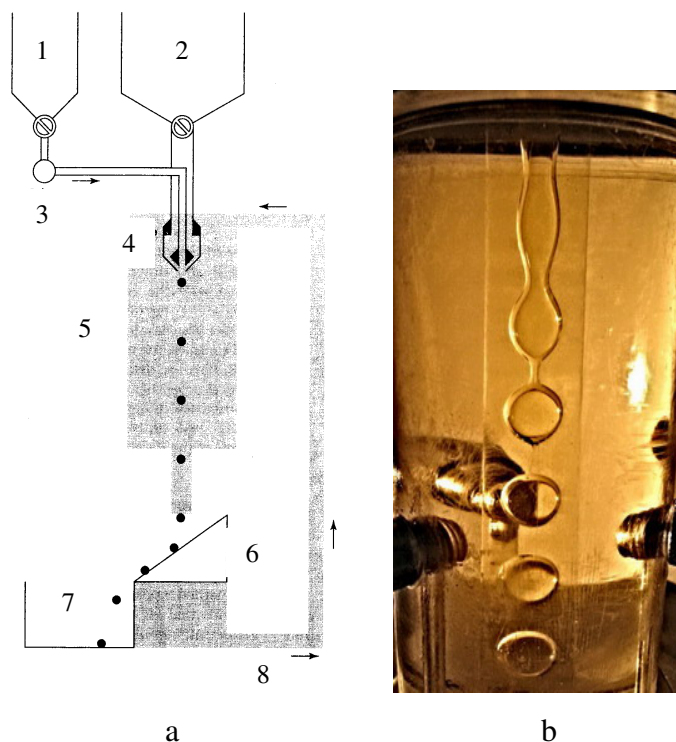
Kapsulu iegūšana ar pilināšanas metodi parādīta 4. attēlā [138]. Lipofils pildījums un kapsulas apvalka sastāvs atrodas atsevišķās apsildāmās tvertnēs. Pildījums un apvalka materiāls tiek sūknēti caur koncentrisku dubulto cauruli, ar pildījumu iekšējā caurulē. Pildījums tiek pumpēts pulsējot, dodot pildījuma tilpumu no 20 līdz 600 mg. Pateicoties pulsācijai, apvalka materiāls, kas plūst nepārtraukti pa ārējo caurulīti, saraujas pēc katras pulsācijas, kā rezultātā kapsulas atraujas viena no otras. Kapsulu veidošanās ir atkarīga no virsmas spraiguma starp pildījumu un apvalka materiālu. Apvalka materiāls parasti ir hidrofilis un tam piemīt lielāks virsmas spraigums. Tā kā sistēma cenšas samazināt virsmas spraigumu, veidojas pilieni, kuri sastāv no ārējā hidrofila apvalka un lipofila pildījuma. Rezultātā veidojas bezšuvju apaļas mīkstas kapsulas. Koncentrisko cauruļu gals atrodas dzesējošā vannā, kas satur šķidrumu (piem., vazelinēļļu), kas nejaukas ar apvalka materiālu, + 4 °C temperatūrā. Ātrā atdzesēšana nodrošina apvalka materiāla transformāciju no sola – gelā un tādējādi elastīgas, stingras ārējās plēves veidošanos. Beigās mīkstās kapsulas tiek savāktas, mazgātas organiskajā šķīdinātājā, lai atdalītu eļļas paliekas, un žāvētas pie relatīvā mitruma 20 % infrasarkanajos tuneļos [136, 138].

Viena Globex metodes priekšrocība ir bezšuvju kapsulu iegūšana, kurām ir minimāla tecēšanas iespēja. Process ir samērā lēts, jo nav apvalka materiāla atkritumu. Metodē iegūst precīzi dozētu formu $\pm 1,5\%$. Tomēr ir arī metodes ierobežojumi, kas saistīti ar pilienu veidošanās fizikāliem principiem, t.i. optimālu virsmas spraigumu starp apvalka un pildījuma materiālu [138]. Iekapsulēšanai var izmantot tikai viegli tekošus neūdens pildījumus, kuriem blīvums un viskozitāte ir tuvi eļļu rādītājiem [165]. Metodes ražošanas jauda 10 000 – 40 000 kapsulu stundā, atkarībā no kapsulu izmēra un pildījuma materiāla [138].

Kā apvalka materiālu Globex metodē var izmantot želatīnu, nātrija alginātu un agaru maisījumā ar glicerīnu [132]. Ir ziņots, ka kapsulu iegūšanai kā plēvi veidojošas vielas izmantoti ogļūdeņražu polimēri, alkilceluloze, hidroksialkilceluloze, dabīgas un sintētiskas gumijvielas kopā ar poliglicerīnu, sorbitolu, polietilēnglikolu, proplilēnglikolu, polipropilēnglikolu, oligosaharīdiem, saharozes esteriem, glicerīdiem, sorbitāna esteriem. Kā kapsulu pildījums izmantotas augu eļļas, kokosriekstu eļļa, piparmētras eļļa u.c. [166].

Pēc tāda paša principa darbojas arī iekārta Spherex (Japāna), kura ļauj iegūt īpaši maza izmēra kapsulas no 1 līdz 7 mm diametrā. Šādi iekapsulē lipofilas suspensijas hidrofilā apvalkā [167], kā arī hidrofilus pildījumus, piem., ūdens šķīdumus, lipofilā apvalkā no glicerīna un saharozes taukskābju esteriem, kā uztvērēju izmantojot hidroksipropilcelulozes ūdens šķīdumu [168]. Japānas zinātnieki ziņo par ļoti maza izmēra (0,5 – 5 mm) kapsulu

iegūšanu, modificējot aparāturu kapsulu iegūšanai [169, 170], vai izmantojot izkausēto cieto pildījumu (palmu vasku ar augstu kušanas temperatūru 86 °C) [171]. Hidrofilo pildījumu iekapsulēšana bezšuves želatīna, alginātu vai agara kapsulās ir iespējama iekārtā, kurā var iegūt trīsslāņu kapsulas [172]. Ziņots par šķidrā slāpekļa izmantošanu kapsulu uztveršanai, kas ir ķīmiski inerts un neatstāj piesārņojumu uz kapsulu virsmas [165].



4. attēls. Kapsulu iegūšana ar pilināšanas metodi:

- a. Globex iekārtas shēma (pēc *Fridrun Podczeck*, 2004 [137]): 1. pildījums, 2. kapsulu apvalkus veidojošs šķīdums, 3. pulsējošais sūknis, 4. dozējošais uzgalis, 5. dzesēšanas vanna, 6. siets, 7. kapsulu savākšana, 8. dzesējošā šķidruma cirkulācija;
- b. mīksto bezšuvju kapsulu veidošanās process (<http://capsulator.narod.ru/capsulator.html> (sk. 21.08.09.).

1.3.1.3. Kompozīcijas kapsulu pildīšanai

1.3.1.3.1. Kapsulu pildīšana ar cietas konsistences pildījumiem

Cietajās kapsulās pilda pulverus, granulas, peletes, mikrokapsulas, tabletes un dažādas šo pildījumu kombinācijas [127, 141, 143, 149, 173, 174]. Visām kompozīcijām pildīšanai kapsulās ir jāatbilst sekojošām galvenajām prasībām: tām ir vienmērīgi jāpildās kapsulās, nodrošinot dozēšanas precizitāti; jāatbrīvo aktīvā viela tādā formā, lai tā varētu uzsūkties organismā; jāatbilst kvalitātes standartiem [127]. Pildīšanai cietajās kapsulās galvenokārt tiek izveidotas pulveru kompozīcijas. Tie parasti ir aktīvo vielu maisījumi ar palīgvielām:

pildvielām ar labām sablīvēšanās īpašības; smērvielām, kuras novērš pulveru pielipšanu pie metāla detaļām; slīdvielām pulveru birstamības uzlabošanai; virsmas aktīvām vielām, kuras uzlabo mitrināšanos ar ūdeni; irdinātājvielām pulveru masas sairšanas uzlabošanai, un stabilizatoriem. Trīs galvenie faktori pulveru sastāva kompozīcijas izveidošanā: laba birstamība, nepielipšana pie dozējošā instrumenta, laba sablīvēšanās [127, 141, 143]. Birstamības uzlabošanai parasti izmanto slīdvielas, kaut gan dažas vielas var būt arī ar smērvielas un pretsalipšanas vielas īpašībām. Birstamības uzlabošanai šādas vielas darbojas samazinot adhēziju un kohēziju. Biežāk lietojamās slīdvielas ir talks, kukurūzas ciete, magnija stearāts (un citi stearāti), tās samazina vai izmaina pulveru daļiņu elektrostātisko mijiedarbību [139, 143, 149, 175].

1.3.1.3.2. Kompozīcijas mīksto kapsulu pildīšanai

Mīksta kapsula ir divfāzu dozēta forma: tai ir cietas fāzes apvalks un šķidrās fāzes pildījums [24].

Mīkstajās kapsulās iepildāmām kompozīcijām ir jāatbilst sekojošām prasībām:

- jā saglabā aktīvo vielu ķīmiskā stabilitāte;
- jā uzlabo aktīvo vielu biopieejamība;
- jā nodrošina efektīvs un drošs iekapsulēšanas process;
- jā veido fizikāli stabila gatava dozēta forma [25].

Mīksto želatīna kapsulu pildīšanas procesā tehnoloģiski svarīgi faktori ir iepildāmās masas temperatūra, viskozitāte un virsmas aktivitāte, lai nodrošinātu precīzu dozējošo sūkņu darbību temperatūrā līdz 35 °C un tīru (bez “diegu” veidošanās) atdalīšanos no dozējoša uzgaļa. Pildījumam jāiztur arī augstāka temperatūra līdz 37 – 40 °C kapsulu aizkausēšanas laikā. Suspensējamo vielu daļiņu lielumam jābūt līdz 200 μm, lai nodrošinātu pēc iespējas lielāku suspensiju homogenitāti [25].

Mīksto kapsulu pildījums var tikt izveidots kā šķīdums vai mīkstas konsistences masa, suspensija, mikro- vai nanoemulsijas prekonzentrāts. Šādu kompozīciju izveides iemesls ir arvien pieaugošas prasības jaunu aktīvo vielu biofarmaceitiskajām īpašībām [25].

Lipofilie šķidrums un augu eļļas bieži tiek lietotas kapsulu pildījuma kompozīciju izveidei, kaut gan to spēja šķīdināt zāļu vielas ir ierobežotas [24]. Lipofilie šķīdumi un suspensijas tradicionāli tiek lietoti kā mīksto kapsulu pildījums taukos šķīstošo vitamīnu (A, D, E), vielu ar nepatīkamo garšu un smaržu (B grupas vitamīnu, augu ekstraktu), pret skābekli un gaismu jutīgo aktīvo vielu un stipri iedarbīgo, mazās koncentrācijās lietojamo

aktīvo vielu iekapsulēšanai. Šādu kompozīciju izveidei izmanto rafinētas augu eļļas (sojas, zemesriekstu, olīvu u.c.), rīcineļļu, vidējo ķēžu triglicerīdus. Viskoziātes palielināšanai izmanto hidrogenizētas eļļas (piem., hidrogenizēto rīcineļļu), vaskus (piem., bišu vasku) [25].

Iekapsulēšanai mīkstajās želatīna kapsulās lieto arī hidrofilās kompozīcijas. Parasti tiek lietoti polārie šķidrums ar samērā lielu molekulmasu (piem., PEG 400, PEG 600). Mazāka izmēra hidrofilās molekulas, tādas kā etanols vai ūdens, var tikt inkorporētas kapsulā mazā daudzumā, parasti ne vairāk par 10 % no pildījuma masas [24]. Kaut gan ziņots par kompozīcijām, kuras satur etanolu līdz 10 – 30 % ar taukskābju mono- un diglicerīdiem (glicerīna monoricinoleātu, monokaprilātu, monodikaprilātu, monodikaprātu) [176]. Puscietas konsistences un suspensiju kompozīciju izveidošanai izmanto kombinācijas no zemas molekulmasas polietilēnglikoliem (PEG 300 – 600) ar augstmolekulāriem cietas konsistences polietilēnglikoliem (PEG 4000 – 10000). PEG saturošo hidrofilo kompozīciju veidā uzlabo biopieejamību daudzām ūdenī un eļļā nešķīstošām vai slikti šķīstošām vielām, kā arī iekapsulē stipri iedarbīgas, mazās devās lietojamās vielas [25, 177–181].

Vielas, kuras nešķīst kapsulas pildījuma šķīdinātājā, tiek ievadītas kā suspensijas. Izmantojot atbilstošus šķīdinātājus, var uzlabot slikti šķīstošu vielu biopieejamību no mīkstajām kapsulām, salīdzinot ar tabletēm vai cietajām kapsulām [24, 25].

Kā mīksto kapsulu pildījums pieaugošu interesi izraisa pašemulģējošās sistēmas – kompozīcijas no eļļām un nejonogēnām virsmas aktīvām vielām (VAV), kuras ātri disperģējas kuņģa-zarnu sulā, spontāni veidojot eļļa/ūdenī tipa emulsiju. Īpaši jāatzīmē šādu kompozīciju izveidošanas lietderīgums slikti šķīstošu aktīvo vielu un vielu, kuras slikti adsorbējas kuņģa-zarnu traktā, iekapsulēšanai [24, 25, 182]. Lai kuņģa-zarnu traktā izveidotos mikro- vai nanoemulsija, kapsulā tiek ievietots prekoncentrāts, kas satur lipīdu komponentu, vienu vai vairākas VAV un, ja nepieciešams, ko-šķīdinātāju (piem., etanolu, propilēnglikolu). Šāds prekoncentrāts spontāni veido eļļa/ūdenī tipa mikro- vai nanoemulsiju, atšķaidoties kuņģa-zarnu sulā. Mikroemulsijās pilienu izmērs ir submikrometru lielumā, nanoemulsijas satur līdz 100 nm lielus pilienus. Mikroemulsijām un nanoemulsijām ir spēja solubilizēt aktīvās vielas un uzturēt tās šķīdumā pēc atšķaidīšanās kuņģa-zarnu sulā, šādi veicinot aktīvo vielu absorbciju [24, 25, 182–184]. Mikroemulsijas prekoncentrāta veidā iekapsulētas ibuprofēna [185], ciklosporīna [184, 186] u.c. slikti šķīstošo vielu kompozīcijas.

1.3.1.3.3. Šķidrumu un puscieto masu pildīšana cietajās kapsulās

Šķidro un puscieto (mīksto) masu pildīšana cietajās kapsulās paver plašas iespējas dažādu kompozīciju pagatavošanai. Dažos aspektos tām ir priekšrocības, salīdzinot ar citām cietām perorālām dozētām formām [187]. Šķidro un mīksto masu saturošo cieto kapsulu priekšrocības, salīdzinot ar tabletēm un cieto pildījumu saturošām cietām kapsulām ir uzlabota aktīvo vielu biopieejamība, mazās koncentrācijās lietojamo aktīvo vielu dozēšanas precizitāte, stipri iedarbīgo un indīgo vielu putekļu rašanās samazināšana ražošanas procesā, aktīvo vielu ar zemu kušanas temperatūru tehnoloģiskā procesa vienkāršošana, lielāka stabilitāte, kontrolēta aktīvās vielas atbrīvošanās no dozētas formas [174, 188].

Ūdenī slikti šķīstošo vielu biopieejamība var tikt uzlabota, veidojot ar tām šķidrās un pusciētās kompozīcijas mīkstajās vai cietajās kapsulās [187, 189]. Ar šķidrumiem parasti tiek pildītas mīkstās kapsulas. Tomēr ir dažas svarīgas īpašības, kuras piemīt ar šķidrumiem un pusciētām masām pildītām cietām kapsulām [189].

Cieto kapsulu pildīšana ir vienkāršāka. Atšķirībā no mīkstajām želatīna kapsulām, kurās apvalka pagatavošana un kapsulas pildīšana notiek vienā procesā, cietās kapsulas tiek ražotas tukšas un pildītas atsevišķā tehnoloģiskā operācijā, kuru var veikt cits ražotājs. Lielākā daļa kapsulu pildīšanas automātu var tikt pārveidota cieto kapsulu pildīšanai ar aukstiem vai siltiem šķidrumiem [173, 174, 188, 189].

Mīksto želatīna kapsulu ražošanas procesā viens no kritiskiem momentiem ir mitro kapsulu žāvēšana, kas notiek vairākas dienas. Šajā laikā var notikt ūdenī un glicerīnā šķīstošo vielu pāreja no kapsulas pildījuma apvalkā, kā arī apvalka mitrums var negatīvi ietekmēt pret mitrumu jutīgo vielu stabilitāti [190]. Ir pierādīts, ka, palielinoties glicerīna daudzumam un mitruma saturam kapsulas apvalkā, palielinās skābekļa caurspiešanās spēja caur apvalku [160]. Tā kā cietās kapsulas nesatur glicerīnu, to caurlaidība ir mazāka [189].

Cietajās želatīna kapsulās var pildīt šķidrumus, kā arī tiksotropas un paaugstinātā temperatūrā mīkstās (termomīkstinošās) sistēmas [173, 174, 188, 189] un cietās dispersijas (piem., laktozes / poloksamēra dispersiju) [191]. Šādi pildījumi tiek sašķidrināti, sildot termomīkstinošos maisījumus (pēc iepildīšanas kapsulās tie atdziest un sacietē), vai maisot tiksotropos maisījumus (tie veido blīvu masu kapsulā, atgriežoties miera stāvoklī) [173, 191]. Termomīkstinošo sistēmu veidošanai parasti izmanto palīgvielas, kuras istabas temperatūrā ir vaskveidīgas, puscietas masas un kuras kūst 26 – 70 °C temperatūrā [192]. Šīs kompozīcijas ir līdzīgas tām, kuras pilda arī mīkstajās kapsulās, tomēr ir viena svarīga atšķirība: šīm

kompozīcijām var būt kušanas temperatūra virs 35 °C, kura ir maksimālā pildījuma temperatūra mīksto kapsulu presēšanas laikā [173, 191].

Kapsulu pildījuma kompozīcijās aktīvās vielas var būt izšķīdinātas vai disperģētas lipofilos šķīdumos un eļļās: augu eļļās (saulespuķu, zemesriekstu, olīvu u.c.), triglicerīdos un taukskābju esteru (piem., glicerīna monostearātā), hidrogenizētās eļļās, tiksotropos hidroforos maisījumos ar aerosilu u.c.; hidrofilās vielās: polietilēnglikolos, kuri ir cieti istabas temperatūrā, bet pārvēršas šķīdumā sildot (PEG ar lielu molekulmasu), šķīdros polioksietilēna-polioksipropilēna kopolimēros [139].

Pildot cietajās kapsulās kompozīcijas, kuras ir šķīdros istabas temperatūrā, ir jāveic kapsulu hermetizācija ar želatīna vai spirta-ūdens šķīdumu speciālajās mašīnās [127, 173, 174, 188, 189].

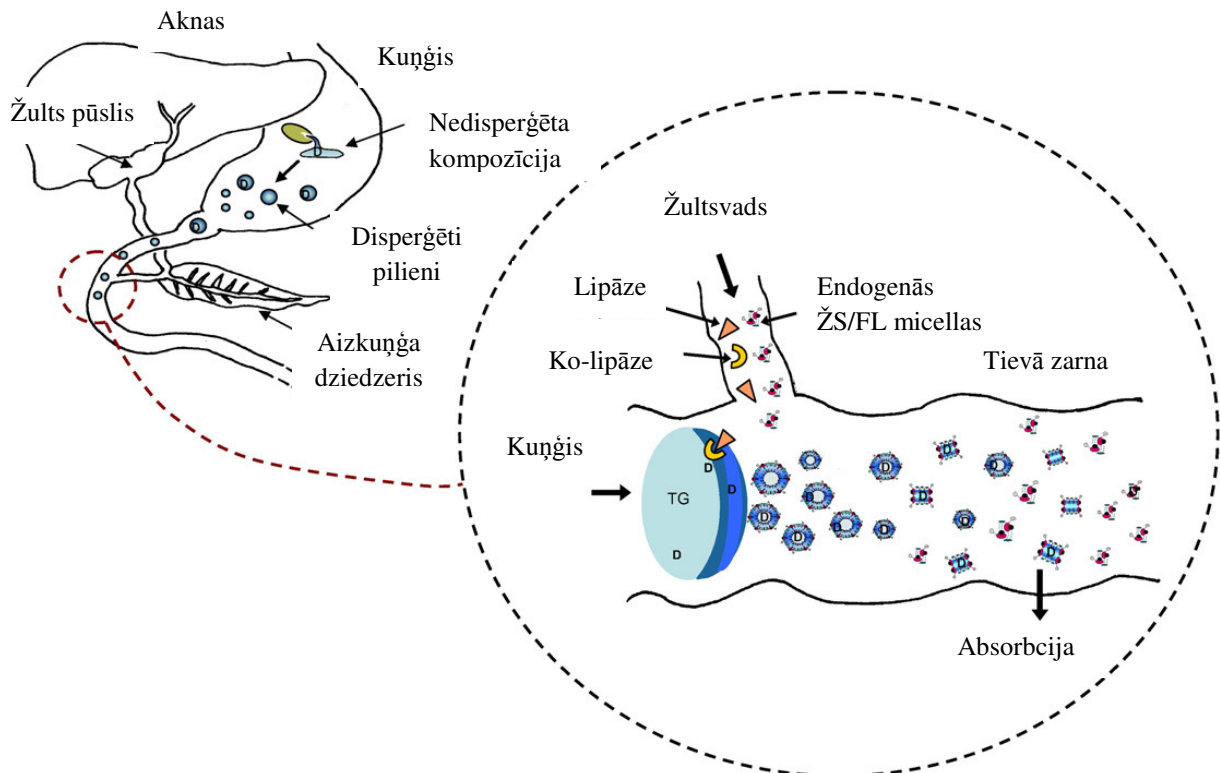
1.3.2. Lipīdus saturošas aktīvo vielu piegādes sistēmas

Lipīdus saturošas aktīvo vielu piegādes sistēmas pārstāv plašu kompozīciju spektru, kuras veidotas no lipofilām, amfifilām un hidrofilām palīgvielām, un kuras spēj solubilizēt ūdenī slikti šķīstošas un lipofilas aktīvās vielas, paaugstinot to biopieejamību, lietojot perorāli [182, 192–196].

1.3.2.1. Lipīdi un aktīvo vielu absorbcija

Perorāli lietotas lipīdus saturošas kompozīcijas tiek pakļautas fizioloģiskam gremošanas procesam, kura laikā tās pārveidojas, ievērojami mainot īpašības, pirms sasniedz absorbcijas vietu [182]. (Skat. 5. attēlā).

Pēc lipīdus saturošas dozētas formas ieņemšanas, sākumā tās saturs disperģējas kuņģī, kur sākas eksogēno (pārtikas vai dozētas formas sastāvā esošo) lipīdu gremošanas process. Pret skābi izturīgās lipāzes (no siekalu dziedzeru un kuņģa gļotādas) hidrolizē triglicerīdus līdz diglicerīdiem un brīvām taukskābēm [182, 197, 198]. Skābes izturīgām lipāzēm ir lielāka afinitāte pret vidējo ķēžu triglicerīdiem, salīdzinājumā ar garo ķēžu triglicerīdiem, tās nehidrolizē fosfolipīdus vai holesterīna esteru. Garo ķēžu taukskābju gremošanas procesa produkti inhibē skābes izturīgās lipāzes, tāpēc tās hidrolizē tikai apmēram 10 – 30 % no ieņemto triglicerīdu daudzuma [197].



5. attēls. Lipīdu gremošanas process un aktīvo vielu solubilizācija kuņģa-zarnu traktā.

TG – triglicerīdi, D – aktīvā viela, ŽS – žults sāļi, FL – fosfolipīdi (pēc Porter *et al.*, 2007 [199]).

Kuņģī notiek lipīdus saturošu kompozīciju primārā emulģēšana pirms nokļūšanas divpadsmitpirkstu zarnā [197, 199]. Rupjo emulģēšanu (veidojas lipīdu pilieni 1 – 100 μm lielumā) pastiprina kuņģa motilitāte un veicina pārtikā esošo fosfolipīdu, proteīnu un polisaharīdu klātbūtne, kā arī daļējās triglicerīdu lipolīzes produkti, kuri darbojas kopā un stabilizē izveidojušos sistēmu eļļā/ūdenī [197].

Lipīdu klātbūtne divpadsmitpirkstu zarnā stimulē žults sāļu, fosfolipīdu un holesterīna sekrēciju no žults pūšļa, un aizkuņģa dziedzera šķidruma sekrēciju, kas satur aizkuņģa dziedzera lipāzi un ko-faktoru – ko-lipāzi. Šo savienojumu ietekmē veidojas maza izmēra stabili eļļas pilieni [197].

Tievajās zarnās aizkuņģa dziedzera lipāze kopā ar ko-lipāzi pabeidz triglicerīdu hidrolīzi līdz diglicerīdiem, monoglicerīdiem un taukskābēm. Eksogēno lipīdu klātbūtne tievajās zarnās arī stimulē endogēno biliāro lipīdu, t.sk. žults sāļu, fosfolipīdu un holesterīna, sekrēciju no žults pūšļa. Paaugstinoties žults sāļu koncentrācijai, lipīdu gremošanas procesa produkti tiek inkorporēti koloidālās struktūrās, t.sk. multilamelārās un unilamelārās

vezikulās, micellās un jauktās micellās. Šie veidojumi kopā ievērojami palielina gan lipīdu gremošanas procesā izveidojušos savienojumu, gan aktīvo vielu solubilizācijas pakāpi tievajās zarnās [182, 197–199].

Nesen veiktie pētījumi parādīja, ka, lai notiktu žults sekrēcija, pietiek ar samērā mazu eksogēno lipīdu daudzumu, apmēram 2 g, piem., tukšā dūšā ieņemot divas kapsulas ar lipīdus saturošo kompozīciju [197].

Koloidālo struktūru, kuras veidojas lipīdus saturošo aktīvo vielu piegādes sistēmu disperģēšanas un gremošanas procesa laikā, solubilizācijas spēja ir atkarīga no izmantoto lipīdu dabas un daudzuma, citu solubilizējošo palīgvielu klātbūtnes (tādu, kā virsmas aktīvās vielas, ko-šķīdinātāji un ko-VAV) un no endogēno solubilizējošo aģentu (žults sāļu un fosfolipīdu) koncentrācijas tievajās zarnās [197]. *In vitro* gremošanas procesa tievās zarnas modelī bija parādīta žults sāļu, pankreatīna un vides pH svarīga loma β -karotīna pāriešanā no eļļas fāzes ūdens fāzē [200]. Kompozīciju palīgvielas, kuras ir sagremošanas kuņģa-zarnu traktā, spēlē galveno lomu, nosakot aktīvo vielu absorbcijas ātrumu un daudzumu no kuņģa-zarnu trakta [201].

1.3.2.2. Lipīdu šķīdumi un emulsijas

Lipīdi ir taukskābes un to atvasinājumi, kā arī savienojumi, kuri biosintētiski vai funkcionāli pieder šai savienojumu grupai. Lipīdi ir amfifili pateicoties to molekulu struktūrai, kura sastāv no lipofilās daļas – taukskābes(ēm) un hidrofilās daļas, ar kuru šīs taukskābes ir esterificētas. Parasti lipīdu kušanas temperatūra palielinās, palielinoties savienojumu molekulārai masai (ogļūdeņražu ķēdes garumam) un samazinās, palielinoties taukskābju nepiesātinājuma pakāpei, kas arī palielina relatīvo spēju oksidēties [192, 194]. Lipīdi parasti nešķīst ūdenī, tos identificē pēc taukskābju sastāva, kušanas temperatūras, hidrofilu-lipofilās bilances (HLB) un šķīdības nopolārajos organiskajos šķīdinātājos. Lipīdu grupā ietilpst tauki, eļļas, vaski un kompleksie lipīdi, kuri piedalās dažādos bioloģiskos procesos, tādi kā steroli, fosfolipīdi, glikolipīdi, lipoproteīni u.c. [194].

Augu eļļas satur triglicerīdu maisījumus (90 līdz 95 %), kā arī brīvās taukskābes, fosfolipīdus un nepārziepjamos produktus, tādus kā pigmenti un steroli vai taukos šķīstošie vitamīni, piem., tokoferoli un karotinoīdi, kuri darbojas kā dabīgie antioksidanti, novēršot eļļu bojāšanos. Triglicerīdi tiek iedalīti īso ķēžu (< 5 oglekļa atomi), vidējo ķēžu (6 – 12 oglekļa atomi) un garo ķēžu (> 12 oglekļa atomi) triglicerīdos. Tie var būt sintētiski hydrogenizēti, tādējādi palielinās to pretestība pret oksidatīvo degradāciju. Dabīgās eļļas tiek

sadalītas to komponentu glicerīdu frakcijās. Šīs frakcijas tiek izmantotas palīgvielu iegūšanai, kurām piemīt optimālās fizikālās īpašības un aktīvo vielu absorbciju uzlabojošās īpašības, tajā pašā laikā samazinās šo savienojumu oksidēšanās spējas [192, 194].

Galvenie augu eļļu atvasinājumi ir hydrogenizētās augu eļļas, daļējie glicerīdi, polioksiglicerīdi, etoksilētie glicerīdi un taukskābju un dažādu spirtu esteri. Kopējais komponents visos šajos savienojumos ir taukskābes [194].

Emulsijas ir heterogēnās dispersās sistēmas, kuras sastāv vismaz no diviem šķidrumiem, kuri savstarpēji nemišas un viens šķidrums disperģēts citā šķidrumā, veidojot smalkus pilienus, parasti līdz 0,1 mm diametrā. Šādas sistēmas uzrāda minimālo stabilitāti, kura var tikt palielināta, pievienojot emulgatoru, amfifilo materiālu, polimēru vai smalku cietu vielu ārējai fāzei [201–204].

Lipīdu šķīdumi un emulsijas tiek izmantotas ūdenī slikti šķīstošo vielu absorbcijas uzlabošanai. Ziņots par zemesriekstu eļļas izmantošanu mīksto želatīna kapsulu pildījumā, kas uzlaboja aktīvās vielas klometiazola absorbciju [137]. Citā pētījumā mīkstās želatīna kapsulas, kuras saturēja augu eļļu, hydrogenizētu augu eļļu, bišu vasku un sojas lecitīnu, uzrādīja lielāku flufenamskābes koncentrāciju plazmā, salīdzinot ar šīs aktīvās vielas biopieejamību no cietām kapsulām [205].

1.3.2.2.1. Nejonogēnās virsmas aktīvās vielas

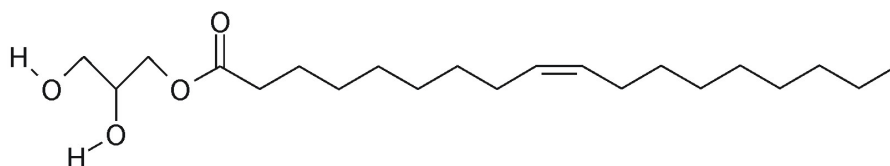
Virsmas aktīvās vielas (VAV) selektīvi adsorbējas uz liofilās un liofobās fāzes robežvirsmas, mainot sistēmas virsmas īpašības [201, 203].

Nejonogēnās VAV tiek plaši lietotas emulsiju stabilizēšanā. Parasti tie ir dažādi esteri, arī augstmolekulārie spirti, alifātiskās vai aromātiskās rindas savienojumi. Tām ir priekšrocība salīdzinājumā ar jonogēnām VAV pateicoties mazākai toksicitātei un mazākai jutībai pret elektrolītiem un vides pH izmaiņām [202, 206]. Nejonogēnās VAV atvieglo aktīvo ingredientu caurspiešanos caur dažādām membrānām. Tās izmanto kontrolētas atbrīvošanās un transdermālo dozēto formu izveidē, un slikti šķīstošo vielu biopieejamības palielināšanai [203, 207].

1.3.2.2.1.1. Monoglicerīdi

Glicerīna un taukskābju esteri ir polārie amfifīlie lipīdi, kurus plaši lieto kā pārtikas emulgatorus. Mono-, diglicerīdi un to atvasinājumi veido 75 % no pasaulē ražoto pārtikā lietojamo emulgatoru daudzuma [208, 209].

Glicerīna monooleāts (monooleīns, GMO) ($C_{21}H_{40}O_4$) (skat. 6. att.) ir dzeltens līdz dzeltenīgi brūns eļļains šķidrums vai pasta ar raksturīgu smaržu. Šķīst hloroformā, etanolā (95 %), ēterī, minerāleļļā, augu eļļās; praktiski nešķīst ūdenī [207].



6. attēls. Glicerīna monooleāta molekulārā struktūra

Rūpnieciski iegūtais glicerīna monooleāts ir oleīnskābes un citu taukskābju glicerīdu maisījums, kas satur galvenokārt monooleātus. Farmaceitiskajā tehnoloģijā GMO izmanto kompozīcijās vietējai lietošanai kā mīkstināšu līdzekli un kā emulgatoru ūdens/eļļā tipa emulsijās. Kā stabilizatoru GMO izmanto arī eļļa/ūdenī tipa emulsijās. GMO paaugstina transdermālo penetrāciju [207]. GMO izmanto lipīdus saturošo aktīvo vielu piegādes sistēmās [210].

Polārie amfifīlie lipīdi, t.sk. GMO, ūdenī veido gelus. Atkarībā no ūdens daudzuma (5 – 40 %) un temperatūras veidojas dažādas vezikulārās struktūras (lamelārās, kubiskās, heksagonālās) [208, 209, 211, 212] ar ļoti lielu virsmas laukumu [212, 213].

Monoglicerīdu vezikulārās struktūras var tikt izmantotas aktīvo vielu kontrolētai atbrīvošanai un prolongēšanai, aizsardzībai no molekulu agregācijas (piem., insulīnam) un oksidēšanās, slikti šķīstošu vielu solubilizēšanai [207–209, 212, 214].

1.4. Dozēto formu stabilitāte

Visiem farmaceitiskiem produktiem uz iepakojuma ir jābūt norādei par šo produktu derīguma laiku un uzglabāšanas apstākļiem. Derīguma laiks tiek definēts kā laika intervāls, kurā ir sagaidāma kvalitātes specififikācijas prasībām atbilstoša farmaceitiskā produkta kvalitāte. Farmaceitisko produktu stabilitātes noteikšanai attiecīgā laika periodā analizē to kvalitātes parametrus, lai pārlicinātos par produktu kvalitātes stabilitāti vai izmaiņām [215–218]. Stabilitātes pētījuma mērķis ir ne tikai raksturot farmaceitiskā produkta degradāciju un nestabilitāti, bet arī noteikt derīguma laiku, kas būtu piemērots visām nākotnē ražotām šā produkta sērijām [219].

Stabilitātes pētījumiem tiek atlasīti paraugi no konkrētā produkta vairākām saražotām sērijām, kurus uzglabā kontrolētos temperatūras un mitruma apstākļos un periodiski veic to kvalitātes pārbaudi. Pamatojoties uz šo pētījumu rezultātiem, farmaceitisko produktu

degradācija tiek modelēta kā laika funkcija. Tādējādi, stabilitātes pētījumos var prognozēt, kā aktīvās vielas un gatavā produkta kvalitāte izmainās ar laiku dažādu apkārtējās vides faktoru, tādu kā temperatūra, mitrums, gaisma, ietekmē un noteikt farmaceitisko produktu derīguma laiku un uzglabāšanas apstākļus [215–218].

Pamatā ir divi dažādi stabilitātes pētījumu tipi: īstermiņa un ilgtermiņa pētījumi. Tipisks īstermiņa pētījums ir paātrināts stabilitātes pētījums stresa apstākļos (paaugstinātā temperatūrā un paaugstinātā relatīvā mitrumā). Paātrinātā stabilitātes pētījuma mērķis ir palielināt produktu ķīmiskās un fizikālās degradācijas ātrumu, tā, lai nozīmīga degradācija varētu būt novērota salīdzinoši īsā laika periodā. Augsta stresa apstākļi paaugstina produkta sabrukšanu un tādējādi samazina laiku, kas nepieciešams pārbaudei [124, 218]. Ilgtermiņa pētījumi tiek veikti apkārtējās vides uzglabāšanas apstākļos. Stabilitātes dati, kas iegūti no ilgtermiņa pētījumiem ir primārie stabilitātes dati, jo tie tiek izmantoti tieši uzglabāšanas laika noteikšanai [217, 220].

Aktīvo vielu galvenie degradācijas procesi ir hidrolīze, oksidēšanās, fotolīze un katalīze (metālu ietekmē), pie kam galvenokārt notiek hidrolīzes un oksidēšanās procesi, bet gaisma un metālu joni katalizē oksidēšanās procesus [125].

Temperatūra ietekmē visus ķīmiskos procesus. Parasti temperatūras paaugstinājums par 10 °C izraisa 2 – 5 kārtīgu degradācijas procesu paātrinājumu. Bieži reakcijas ātruma palielināšanās seko Arēniusa vienādojumam kā funkcija no laika – temperatūras kombinācijas: reakcijas ātruma konstantes logaritma diagramma pret absolūtās temperatūras apgriezto lielumu ir taisna līnija [124]. Reakcijas ātrums tad var tikt aprēķināts pie jebkuras temperatūras un ļauj prognozēt ar ekstrapolācijas palīdzību uzglabāšanas laiku istabas temperatūrā. Šis pieņēmums ir pamatā arī paātrinātam stabilitātes noteikšanas testam [125].

Farmaceitisko produktu stabilitātes novērtēšanas modeļi, dizains, stabilitātes analīzes procedūras ir raksturotas Eiropas zāļu aģentūras (EMA) izdotajās vadlīnijās [92, 93].

Vadlīnijas nosaka, ka stabilitātes testēšana jāveic ar 3 mēnešu intervālu pirmajā gadā, ar 6 mēnešu intervālu otrajā gadā un turpmāk reizi gadā. Tā kā farmaceitiskā produkta dažādas sērijas var uzrādīt dažādu degradāciju, vadlīnijas nosaka, ka stabilitātes pētījumi jāveic ar vismaz 3 sērijām [215, 216].

Statistikai novērtēšanai pielieto sērijas faktoru kā fiksēto lielumu un degradācijas ātrumu kā kovarianci [215–217, 221]. Primārā kovariance stabilitātes pētījumos ir glabāšanas laiks. Citas kovariances, tādas kā iepakojuma veids un dozējums, arī var tikt iekļauti

stabilitātes analīzē [219]. Regresijas analīze tiek uzskatīta par piemērotu instrumentu kvantitatīvo stabilitātes datu analīzei derīguma termiņa noteikšanai [215–217, 221].

Vairāki autori savos darbos atspoguļo jautājumus, kas skar stabilitātes pētījumu dizainu, produktu sēriju variāciju ietekmi, divu fāžu derīguma laika noteikšanu, stabilitātes analīzes ar diskrētām atbildēm, derīguma laika noteikšanu produktiem ar vairākiem ingredientiem. Stabilitātes pētījumos šādi raksturojoši lielumi, kā, piem., cietība, krāsa, bieži dod rezultātu diskrētā veidā [217, 219]. Tā kapsulu stabilitātes pētījumā jāiekļauj šādi parametri: aktīvās vielas saturs, mitruma saturs, krāsa, ārējais izskats, forma, trauslums, šķīšana [219].

1.4.1. Krustenisko saišu veidošanās želatīnā

Krusteniskās saites ir kovalentās ķīmiskās saites, kuras rodas starp makromolekulām. No krustenisko saišu esamības, veida un blīvuma lielā mērā ir atkarīgas materiāla mehāniskās un ķīmiskās īpašības (piem., polimēra šķīšanas īpašības) [222].

Šādas krusteniskās saites var veidoties želatīna molekulās kapsulu uzglabāšanas laikā (īpaši mīkstajās želatīna kapsulās). Sairšanas vai šķīšanas testa laikā apkārt kapsulai vai kapsulas pildījumam veidojas gumijai līdzīga, caurspīdīga, ūdenī nešķīstoša plēvīte (membrāna). Šī plēvīte darbojas kā barjera un ierobežo pildījuma atbrīvošanos no kapsulas [223, 224].

Parasti krustenisko saišu veidošanos izraisa aldehīdu klātbūtne aktīvajās vielās, palīgvielās, iepakojuma materiālā, sabrukšanas produktos, kuri veidojas glabāšanas laikā; liels mitrums; UV gaismas, īpaši paaugstinātas temperatūras un mitruma apstākļos; karsēšana, kas var katalizēt aldehīdu veidošanos [188, 224].

Izplatītākās un stingrākās krusteniskās saites veidojas starp vienas želatīna molekulas sānu ķēžu lizīna aminogrupām ar līdzīgām aminogrupām otrā želatīna molekulā [151, 224, 225]. Šo reakciju parasti katalizē aldehīdi: formaldehīds, acetaldehīds, glutāraldehīds, glioksāls un reducējošie cukuri [188, 224, 226]. Aldehīdi var būt kā piemaisījumi mīksto želatīna kapsulu pildījuma vai apvalka sastāvā, kā arī tie var veidoties lipīdu palīgvielu (piem., polisorbāta 80) oksidēšanās rezultātā [151]. Augu polifenoli un flavonoīdi var reaģēt ar želatīnu, veidojot krusteniskās saites [227].

Želatīna kapsulu, kurās ir izveidojušās krusteniskās saites, šķīšanas testa rezultāti uzrāda lēnāku aktīvās vielas atbrīvošanās profilu. Kaut gan, pētot *in vivo* kapsulu ar krusteniskām saitēm sairšanu uz veseliem brīvprātīgajiem ar gamma scintigrāfijas metodi,

konstatēts, ka šo kapsulu un svaigi pagatavoto, stresa apstākļiem nepakļauto kapsulu sairšanas laiks un aktīvo vielu atbrīvošanās bija ekvivalenti [228, 229]. Krusteniskās saites, kuras veidojas želatīna molekulās aldehīdu ietekmē, ir neatgriezeniskas, un kapsulas sairšanas procesā jābūt iesaistītam citu saišu pārraušanas mehānismam, t.i. enzīmu iedarbības rezultātā tiek šķeltas peptīdu saites proteīnu ķēdēs. Šā atklājuma rezultātā ir akceptēts izmantot enzīmus dozētu formu sairšanas un šķīšanas testa veikšanai [188]. Enzīmu klātbūtne šķīšanas vidē paātrina krusteniski saistītā želatīna plēvītes šķīšanu un pildījuma atbrīvošanos. Kapsulu sairšanas vai šķīšanas testa veikšanai var izmantot pepsīnu ar vides pH 1 – 6 un pankreatīnu ar vides pH 6,8 – 8 [230, 231], kā arī VAV (nātrija laurilsulfātu, žults sāļus, polioksietilēnsorbitānu u.c.) [223].

Japāņu zinātnieki piedāvā apstrādāt želatīnu ar dzintarskābes anhidrīdu [25, 232]. Sukcinētais želatīns tiek iegūts reakcijā starp želatīna molekulu aminogrupām un dzintarskābes anhidrīdu. Sukcinētais želatīns ātri šķīst, tā gela elastība, adhēzijas spēja un šķīduma viskozitāte ir ekvivalenti parastā želatīna rādītājiem. Šis želatīns ir piemērots nepiesātināto taukskābju, augu ekstraktu u.c. vielu iekapsulēšanai [233].

2. MATERIĀLI UN METODES

2.1. Materiāli

2.1.1. Izejviela

Skuju biežais ekstrakts (SBE) iegūts no Latvijas mežos augošo priežu zaleņa (skujām, jauniem dzinumiem un zariņiem, kuri nav pārkoksnējušies). SBE ir nepolāros šķīdinātājos šķīstošās priedes zaleņa ekstraktvielas. To sastāvs dots 1. pielikumā [6, 59].

Darbā izmantots SBE₁ ar mitruma un gaistošo vielu saturu ne vairāk par 40 % un SBE₂ ar mitruma un gaistošo vielu saturu ne vairāk par 10 %. SBE₁ un SBE₂ saņemti no A/S „Biolat” (Latvija). SBE₁ kvalitāte atbilst Farmakopejas priekšraksta FP 95-0002/42-26-95 „Fitestens” prasībām [234], SBE₂ kvalitāte atbilst LV UTN 000312820-18-2008 „Skuju biežais ekstrakts” A/S Biolat 2008.02.19. prasībām [235] (skat. 2. pielikumu).

2.1.1.1. SBE iegūšanas process

Izejviela SBE₁ un SBE₂ iegūšanai – priežu skuju un ar skujām klāti zariņi līdz 6 mm diametrā. Izejvielu smalcina līdz 6 – 10 mm daļiņu lielumam un 3,5 stundas ekstrahē ar BR-1 markas benzīnu (vai n-heksānu vai Nefrāzi C2 – 80/120) attiecībā 1 : 5. Benzīna izvilkumu nostādina 12 stundas 14 – 18 °C temperatūrā vaska nogulsnešanai. Pēc tam IR-1M2 tipa rotorietvaicētājā 60 – 70 °C temperatūrā atdestilē benzīnu. Biezā atlikuma skābo daļu neitralizē ar nātrija hidroksīda šķīdumu 70 – 80 °C temperatūrā līdz pH sasniedz 8,0 – 9,0 [234–236].

2.1.2. Citas aktīvās vielas un palīgvielas

SBE₁ un SBE₂ saturošo dozēto formu pagatavošanai izmantotas 2., 3. un 4. tabulā norādītās aktīvās vielas un palīgvielas.

2. tabula. SBE₁ saturošo cieto želatīna kapsulu eksperimentālo paraugu gatavošanai izmantotās aktīvās vielas un palīgvielas

Nr.	Nosaukums	Ražotājs vai piegādātājs	Kvalitātes atbilstība
1.	Kalcija karbonāts	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Calcium carbonate, 01/2008:0014, corrected 6.0
2.	Magnija oksīds	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Magnesium oxide, light, 01/2008:0040, corrected 6.0
3.	Alumīnija hidroksīds	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Aluminium oxide, hydrated, 01/2008:0311, corrected 6.0

Nr.	Nosaukums	Ražotājs vai piegādātājs	Kvalitātes atbilstība
4.	Bismuta subnitrāts	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Bismuth subnitrate, heavy, 01/2008:1494, corrected 6.0
5.	Laktoze, SorboLac 400	Meggle, Vācija	Ph. Eur. 6.0: Lactose monohydrate, 01/2008:0187, corrected 6.0
6.	Lakricas sausais ekstrakts	A/S RFF, Latvija	PSRS VF X, priekšraksts Nr. 260
7.	Kviešu pārtikas klijas	SIA Mārupes dzirnavas	LV TN 000311356-001-93
8.	Talks	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Talc, 01/2008:0438, corrected 6.0
9.	Kalcija stearāts	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Calcium stearate, 01/2008:0882, corrected 6.0
10.	Stearīnskābe	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Stearic acid, 01/2008:1474, corrected 6.0
11.	Magnija stearāts	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Magnesium stearate, 01/2008:0229, corrected 6.0
12.	Nātrija metabisulfīts	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Sodium metabisulphite, 01/2008:0849
13.	Tvins-80, TWEEN TM 80V PHARMA, Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate vegetable sourced	UNIQEMA, Lielbritānija	Ph. Eur. 6.0: Polysorbate 80, 01/2008:0428
14.	Etilspirts	SIA LAKO, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Ethanol (96 per cent), 01/2008:1317
15.	Attīrīts ūdens	-	Ph. Eur. 6.0: Water, purified, 01/2008:0008
16.	Cietās želatīna kapsulas Nr.0 un Nr.00	Capsugel	Capsugel specifikācija

3. tabula. SBE₁ un SBE₂ saturošo mīksto želatīna kapsulu eksperimentālo paraugu gatavošanai izmantotie emulgatori

Nr.	Nosaukums	Ražotājs vai piegādātājs	Kvalitātes atbilstība
1.	Tvins-20, TWEEN 20 PHARMA Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate	UNIQEMA, Lielbritānija	Ph. Eur. 6.0: Polysorbate 20, 01/2008:0426
2.	Tvins-40, TWEEN 40 PHARMA Polyoxyethylene (20) sorbitan monopalmitate	UNIQEMA, Lielbritānija	Ph. Eur. 6.0: Polysorbate 40, 01/2008:1914
3.	Tvins-60, TWEEN 60V PHARMA Polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate	UNIQEMA, Lielbritānija	Ph. Eur. 6.0: Polysorbate 60, 01/2008:0427
4.	Tvins-65, TWEEN 65, Polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate	UNIQEMA, Lielbritānija	UNIQEMA specifikācija: Polysorbate 65
5.	Tvins-80, TWEEN TM 80V PHARMA, Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate vegetable sourced	UNIQEMA, Lielbritānija	Ph. Eur. 6.0: Polysorbate 80, 01/2008:0428
6.	Glicerīna monostearāts, RYLO TM MD 50 PHARMA, Mono-diglyceride	DANISCO, Dānija	Ph. Eur. 6.0: Glycerol monostearate 40-55, type 1, 01/2008:0495
7.	Glicerīna monooleāts, RYLO TM MG 20 PHARMA, Glycerol Monooleates (Nominal 90%)	DANISCO, Dānija	Ph. Eur. 6.0: Glycerol mono-oleate, 01/2008:1430, corrected 6.0
8.	Diacetilētie monoglicerīdi,	DANISCO,	USP/NF: Diacetylated monoglycerides

Nr.	Nosaukums	Ražotājs vai piegādātājs	Kvalitātes atbilstība
	RYLO™ AC 19 PHARMA, Diacetylated Monoglycerides	Dānija	
9.	Sorbitāna monooleāts, MULTEC Soral MO liq, Sorbitan Monooleate	PURATOS, Beļģija	Ph. Eur. 6.0: Sorbitan oleate, 01/2008:1041
10.	Sorbitāna monostearāts, MULTEC Soral MS, Sorbitan Monostearate	PURATOS, Beļģija	Ph. Eur. 6.0: Sorbitan stearate, 01/2008:1043
11.	Sorbitāna monopalmitāts, Sorbital T40P	AS Recipe plus, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Sorbitan palmitate, 01/2008:1042
12.	Emulgators T-2	A/S RFF, Latvija	FP 42-403-72
13.	Pentols	Ņižņij Novgorodas KFR, Krievija	TN 18-16/350-80
14.	Monoglicerīdi destilētie	Ņižņij Novgorodas KFR, Krievija	TN 10-1197-95

4. tabula. SBE₁ un SBE₂ saturošo mīksto želatīna kapsulu iegūšanai izmantotās palīgvielas

Nr.	Nosaukums	Ražotājsvai piegādātājs	Kvalitātes atbilstība
1.	Zemesriekstu eļļa	STANCHEM, Polija	Ph. Eur. 6.0: Arachis oil, refined, 01/2008:0263
2.	Saulespuķu eļļa	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Sunflower oil, refined, 01/2008:1371
3.	Sojas eļļa	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Soya-bean oil, refined, 01/2008:1473
4.	Oļīvu eļļa	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Olive oil, refined, 01/2008:1456
5.	Želatīns	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Gelatin, 01/2008:0330, corrected 6.0
6.	Glicerīns	STANCHEM, Polija	Ph. Eur. 6.0: Glycerol, 01/2008:0496
7.	Nipagīns	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Methyl parahydroxybenzoate, 01/2008:0409, corrected 6.0
8.	Nātrija metabisulfīts	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Sodium metabisulphite, 01/2008:0849
9.	Salicilskābe	Farma Balt, Latvija	Ph. Eur. 6.0: Salicylic acid, 01/2008:0366, corrected 6.0
10.	Attīrīts ūdens	-	Ph. Eur. 6.0: Water, purified, 01/2008:0008
11.	Izopropilspirts	STANCHEM, Polija	Ph. Eur. 6.0: Isopropyl alcohol, 01/2008:0970
12.	Cietās želatīna kapsulas Nr.0	Capsugel	Capsugel specifikācija

2.1.3. Reaktīvi

Šķīdinātājs Nefrāze C2-80/120: *petroleum solvent*, ogļūdeņražu maisījums, viršanas temperatūra 80 – 120 °C, dielektriskā konstante 2,3 (Latvijas ķīmija); etilspirts 96 % (tilp.) (SIA LAKO, Latvija), Ph. Eur. 6.0; 01/2008:1317; petrolēteris 40 – 80 (Carl Roth, Vācija);

dietilēteris (STANCHEM, Polija); hloroforms (STANCHEM, Polija); acetons (STANCHEM, Polija); n-heksāns (STANCHEM, Polija); etilacetāts (Lach:ner, Čehija); benzols; plānslāņa hromatogrāfijas plates Al SIL G/UV 254 (Whatman, Vācija); alumīnija oksīds, aktīvais γ - Al_2O_3 pēc *Brockmann* II pakāpes hromatogrāfijai neitrālais (Reachem, Slovākija); β -karotīna standarts, tīrība $\geq 97\%$ (Fluka); fosformolibdēnskābe; nātrija karbonāts, bezūdens; nātrija sulfāts, bezūdens; kālija dihromāts; attīrīts ūdens, Ph. Eur. 6.0; 01/2008:0008.

2.1.4. Aparatūra un ierīces

Spektrofotometrs Nicolet Evolution 100 (Thermo Electron Corporation); laboratorijas svāri KERN GS4100-2 (KERN & Sohn GmbH, Vācija); analītiskie svāri ABS 220-4 (KERN & Sohn GmbH, Vācija); mikrošķirces MŠ-I M; UV lampa; elektriskais žāvējamais skapis E5CN SNOL (AB „Umega”, Lietuva); pH-metrs DL-02 (Krievija); birstamības noteikšanas aparāts VP-12-A ar vibrējošu piltuvi (Ukraina); tablešu un kapsulu sairšanas noteikšanas aparāts 545P-AK-1 (Ukraina); ierīce mīksto masu pagatavošanai UPM-2 (Bulgārija); elektriskais sausā gaisa termostats TC-80M-2 (Ukraina); klimatokameras; gaismas mikroskops Nikon THP (Japāna).

2.2. Metodes

2.2.1. SBE un to saturošo preparātu ārējā izskata, krāsas, smaržas un garšas noteikšana

SBE un to saturošo preparātu ārējo izskatu un krāsu nosaka vizuāli, atstarotā izkliedētā dienas gaismā, uznesot to uz pienstikla plates 5 mm biezā slānī. Smaržu un garšu nosaka organoleptiski temperatūrā (15 – 25) °C [235].

2.2.2. SBE identitātes noteikšana

2.2.2.1. Hlorofila pierādīšana

Porcelāna bļodiņā iesver 20 mg SBE_1 vai SBE_2 (vai 100 mg SBE_1 saturoša pulvera), pievieno 5 ml 96 % etilspirta un maisa 10 – 15 min. Šķīdumam jānokrāsojas zaļā krāsā. Iepriekšminētajam šķīdumam jādod rubīnsarkanas krāsas fluorescence UV gaismā 254 nm viļņa garumā [235, 237].

2.2.2.2. Karotinoīdu un nepiesātināto ogļūdeņražu pierādīšana

10 – 20 mg SBE₁ vai SBE₂ izšķīdina 5 ml hloroforma (vai samaisa 100 mg SBE₁ saturoša pulvera ar 5 ml hloroforma un filtrē). Pie 0,5 ml šķīduma pievieno 0,5 ml 10 % fosformolibdēnskābes etilspirta šķīduma*. Sildot ūdens vannā, uz mēģenes malām jāparādās ziliem pilieniem, bet šķīdumam jāiekrāsojas zilgani zaļā krāsā [235, 237].

*10 % fosformolibdēnskābes etilspirta šķīduma pagatavošana. 10,0 g fosformolibdēnskābes samaisa ar 100 ml 96 % etilspirta. Maisījumu karsē līdz viršanai, atdzesē, nfiltrē neizšķīdušo daļu.

2.2.2.3. Karotinoīdu identificēšana ar plānslāņa hromatogrāfiju

Plānslāņa hromatogrāfijas (PSH) apstākļi [128, 234, 237–240]:

- stacionārā fāze: silikagels uz hromatogrāfijas plates;
- mobilā fāze: šķīdinātāju sistēmas (skat. 5. tabulā).

Analizējamais šķīdums. Samaisa 50 mg SBE₁ vai SBE₂ ar 5 ml hloroforma (vai samaisa 100 mg SBE₁ saturoša pulvera ar 5 ml hloroforma un filtrē).

Standarta šķīdums. Izšķīdina 3 mg β-karotīna 5 ml hloroforma.

Analīzes gaita. Uz hromatogrāfijas plates starta līnijas uznes 4 μl analizējamā šķīduma un 2 μl standarta šķīduma. Plati žāvē istabas temperatūrā 5 min, tad ievieto hromatogrāfijas kamerā. Veic hromatografēšanu, kamēr šķīdinātāju fronte sasniedz 10 – 15 cm no starta līnijas. Plati izņem no kameras un žāvē istabas temperatūrā. Kad šķīdinātāji iztvaiko, hromatogrammu aplūko dienas gaismā. Analizējamā šķīduma hromatogrammā jābūt redzamai oranždzeltenas krāsas zonai, kas atbilst β-karotīna pozīcijai ar standarta šķīdumu iegūtajā hromatogrammā.

Karotinoīdu zonu attīstīšanai hromatogrāfijas plati apstrādā ar 10 % fosformolibdēnskābes etilspirta šķīdumu un silda (60 – 80) °C temperatūrā 5 min. Hromatogrammu aplūko dienas gaismā. Analizējamā šķīduma hromatogrammā jābūt redzamai zilās krāsas zonai uz dzeltenzaļā fona, kas atbilst β-karotīna pozīcijai standarta šķīduma iegūtajā hromatogrammā.

2.2.3. Masas zuduma žāvējot noteikšana SBE un to saturošos preparātos

Metodes pamatā ir mitruma daudzuma noteikšana, kas iztvaiko, karsējot materiālu (100 – 105) °C temperatūrā [128, 235].

Apmēram 1 g SBE vai SBE saturoša preparāta, (precīzs iesvars, nosvērts ar precizitāti $\pm 0,0001$ g), ievieto iepriekš līdz pastāvīgai masai izžāvētā sverglāzītē un žāvē žāvējamā skapī (100 – 105) °C temperatūrā 3 stundas. Atdzesē eksikatorā 30 min un sver.

Masas zudumu (W), %, aprēķina pēc formulas:

$$W = \frac{(m_1 - m_2) \times 100}{m} \quad (1)$$

m – SBE (SBE saturoša preparāta) parauga masa, g.

m_1 – sverglāzītes ar paraugu masa pirms žāvēšanas, g;

m_2 – sverglāzītes ar paraugu masa pēc žāvēšanas, g;

Par analīzes rezultātu pieņem vidējo aritmētisko no trīs paraugu paralēliem mērījumiem.

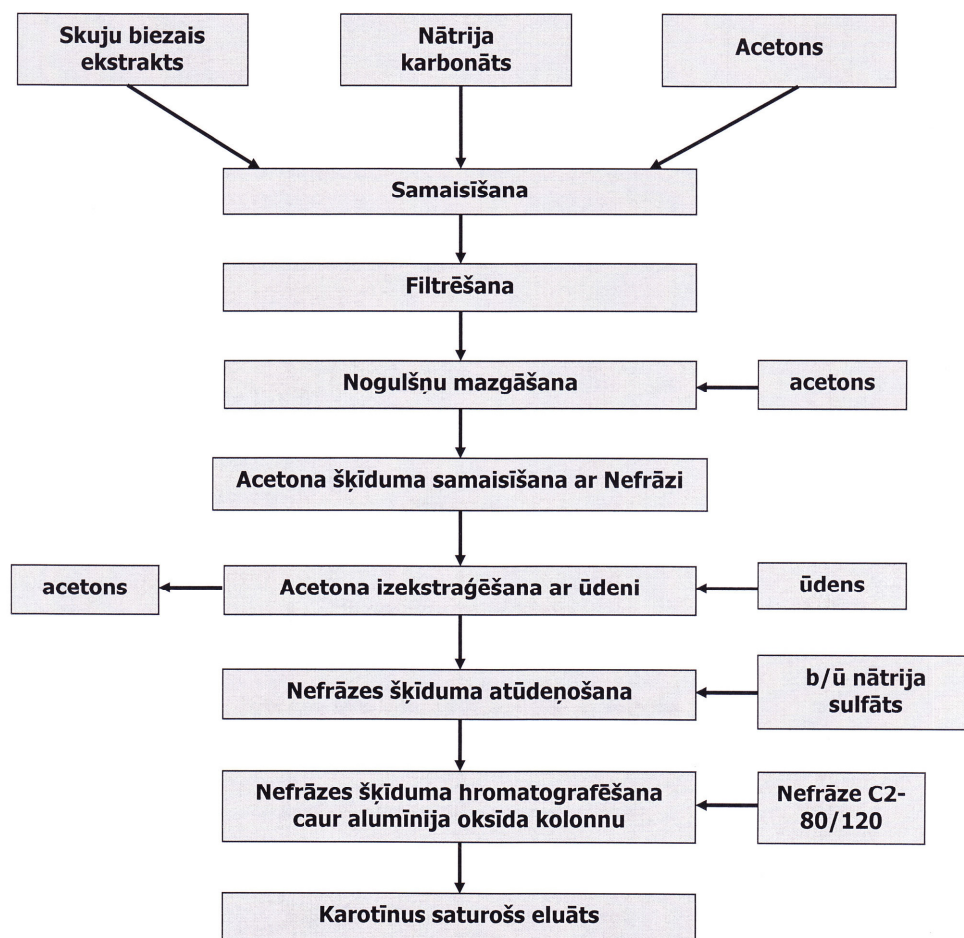
2.2.4. Ūdeņraža eksponenta (pH) noteikšana SBE

1,00 g SBE ievieto 100 ml vārglāzē un šķīdina, enerģiski maisot, 99 ml attīrīta ūdens (20 – 25) °C temperatūrā. Nosaka pagatavotā maisījuma pH [128, 235]. Par analīzes rezultātu pieņem vidējo aritmētisko no trīs paralēliem mērījumiem.

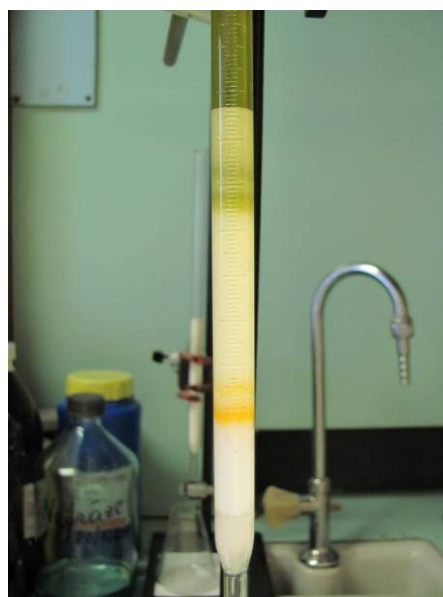
2.2.5. Karotīnu satura noteikšana SBE un to saturošos preparātos

Karotīnu kvantitatīvai noteikšanai izmanto spektrofotometrisko metodi pie viļņa garuma 450 nm pēc to izdalīšanas no SBE, vai no SBE saturošiem preparātiem ar hromatogrāfijas metodi [70, 128, 234, 235]. Hromatografēšanai lieto ar alumīnija oksīdu pildītu kolonnu un Nefrāzi karotīnu eluēšanai [237, 238, 241] (skat. 7. un 8. attēlu).

Par standarta šķīdumu var izmantot ķīmiski tīru β -karotīnu vai kālija dihromāta ūdens šķīdumu, jo karotīns ir samērā nestabila viela, tas oksidējas gaismas un gaisa klātbūtnē [238, 70]. Analīze ir jāveic aptumšotā telpā, sargājot paraugus no tiešiem gaismas stariem [70, 241]. Ar šo metodi nosaka karotīnu summu [238, 241].



7. attēls. Karotīnu izolēšanas shēma no SBE



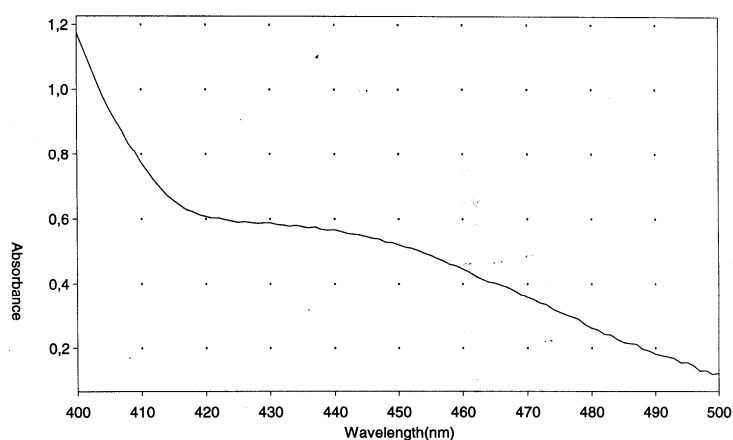
8. attēls. Karotīnu noteikšana ar kolonnas hromatogrāfijas metodi

2.2.5.1. Karotīnu summas kvantitatīvā noteikšana SBE₁ un SBE₂

Apmēram 1 g SBE₁ vai SBE₂ (precīzs iesvars, nosvērts ar precizitāti $\pm 0,0001$ g) piestā samaisa ar 0,5 g nātrija karbonāta. Maisījumam pakāpeniski pievieno 10 ml acetona, saberž ar piestalu un filtrē dalāmā piltuvē. Piestu un nogulsnes uz filtra vairākas reizes mazgā ar nelielām acetona porcijām, līdz filtrāts kļūst bezkrāsains. Acetona šķīdumam dalāmajā piltuvē pievieno 20 ml Nefrāzes un rūpīgi samaisa. Acetona atdalīšanai maisījumam vairākas reizes pievieno nelielas porcijas attīrīta ūdens. Pēc saskalošanas un emulsijas sadalīšanās slāņos mazgājamo ūdeni nolej. Tas nedrīkst saturēt Nefrāzē šķīstošus pigmentus. Nefrāzes šķīdumu atūdeņo ar bezūdens nātrija sulfātu un iepilda hromatogrāfijas kolonnā* tā, lai virs sorbenta būtu Nefrāzes slānis (lai kavētu karotīnu oksidēšanos). Hromatografē ar Nefrāzi, kamēr karotīni, kas atdalījušies no citiem pigmentiem oranždzeltenas zonas veidā, pāriet uztvērējā (100 ml mērkolbā). Hromatografēšanu pārtrauc, kad eluāts kļūst bezkrāsains. Nefrāzes šķīdumu ar karotīniem 100 ml mērkolbā uzpilda ar Nefrāzi līdz atzīmei. Iegūtā šķīduma optisko blīvumu mēra spektrofotometriski pie 450 nm viļņa garuma kivetē ar 10 mm biezu slāni. Paralēli nosaka optisko blīvumu kālija dihromāta standarta šķīdumam**.

*Hromatogrāfijas kolonnas sagatavošana. Stikla hromatogrāfijas kolonnas apakšā ievieto 1 cm biezu vates tamponu. Alumīnija oksīdu samaisa ar Nefrāzi un sagatavoto suspensiju ielej kolonnā tik daudz, lai iznāktu 7 – 10 cm augsts sorbenta slānis.

**Kālija dihromāta standarta šķīduma pagatavošana. 0,3600 g (precīzs iesvars) kālija dihromāta, kas iepriekš izžāvēts (100 – 105) °C temperatūrā līdz nemainīgai masai, kvantitatīvi pārnēs 1000 ml mērkolbā, kurā to izšķīdina un uzpilda ar attīrītu ūdeni līdz atzīmei. Pagatavotais šķīdums pēc krāsas atbilst šķīdumam, kura 1 ml satur 0,00208 mg β -karotīna [234, 235, 242]. Standarta šķīduma absorbcijas spektrs redzams 9. attēlā.



9. attēls. Kālija dihromāta ūdens šķīduma absorbcijas spektrs

Karotīnu saturu sausā preparātā, pārrēķinot uz β -karotīnu, mg % (X), aprēķina pēc formulas:

$$X = \frac{D \cdot 0,00208 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{D_1 \cdot a \cdot (100 - b)} \quad (2)$$

D – analizējamā šķīduma optiskais blīvums,

D_1 – standarta šķīduma optiskais blīvums,

0,00208 – β -karotīna saturs mg 1 ml šķīduma, kas pēc krāsas atbilst kālija dihromāta standarta parauga šķīdumam,

a – SBE₁ vai SBE₂ parauga masa, g,

b – masas zudums žāvējot, %.

Par analīzes rezultātu pieņem vidējo aritmētisko no trīs paraugu paralēliem mērījumiem. Karotīnu summas saturam (pārrēķinot uz β -karotīnu) sausā preparātā jābūt ne mazākam par 30 mg % [234, 235].

2.2.5.2. Karotīnu summas kvantitatīvā noteikšana SBE₂ saturošajās kapsulās (modificētā metode)

Vienas mīkstās želatīna kapsulas pildījuma masu (precīzs iesvars, nosvērts ar precizitāti $\pm 0,0001$ g) samaisa ar 7 ml Nefrāzes un filtrē stikla glāzē. Nogulsnes uz filtra vairākas reizes mazgā ar nelielām Nefrāzes porcijām, līdz filtrāts kļūst bezkrāsains. Nefrāzes šķīdumu iepilda hromatogrāfijas kolonnā. Tālāk rīkojas, kā aprakstīts p.2.2.5.1., izņemot to, ka eluātu uztver 50 ml mērkolbā.

Karotīnu saturu kapsulas pildījumā (ņemot vērā SBE₂ mitruma un gaistošo vielu saturu), pārrēķinot uz β -karotīnu, mg % (X), aprēķina pēc formulas:

$$X = \frac{D \cdot 0,00208 \cdot 50 \cdot 100 \cdot 100}{D_1 \cdot a \cdot (100 - b) \cdot c} \quad (3)$$

D – analizējamā šķīduma optiskais blīvums,

D_1 – standarta šķīduma optiskais blīvums,

0,00208 – β -karotīna saturs mg 1 ml šķīduma, kas pēc krāsas atbilst kālija dihromāta standarta parauga šķīdumam,

a – kapsulas pildījuma parauga masa, g,

b – SBE₂ masas zudums žāvējot, %,

c – SBE₂ daļa kapsulas pildījumā.

Par analīzes rezultātu pieņem vidējo aritmētisko no trīs paraugu paralēliem mērījumiem. Karotīnu summas saturam (pārrēķinot uz β -karotīnu) kapsulas pildījumā (ņemot vērā SBE₂ mitruma un gaistošo vielu saturu) jābūt ne mazākam par 30 mg %.

Karotīnu saturu kapsulā, pārrēķinot uz β -karotīnu, μg (Y), aprēķina pēc formulas:

$$Y = \frac{D \cdot 0,00208 \cdot 50 \cdot 1000 \cdot d}{D_1 \cdot a} \quad (4)$$

D – analizējamā šķīduma optiskais blīvums,

D_1 – standarta šķīduma optiskais blīvums,

0,00208 – β -karotīna saturs mg 1 ml šķīduma, kas pēc krāsas atbilst kālija dihromāta standarta parauga šķīdumam,

a – kapsulas pildījuma parauga masa, g,

d – kapsulas pildījuma masa, g.

Par analīzes rezultātu pieņem vidējo aritmētisko no trīs paraugu paralēliem mērījumiem. Karotīnu summas saturam (pārrēķinot uz β -karotīnu) kapsulā jābūt ne mazākam par 80 μg .

2.2.6. SBE₁ saturošo pulveru birstamības noteikšana

Birstamību nosaka, izmantojot aparātu VA-12-A ar vibrējošu piltuvi. Metodes pamatā ir pulvera izbiršanas no piltuves ātruma noteikšana [128]. Nosvērto pulveri ievieto aparāta piltuvē un ieslēdz aparātu un hronometru. Pēc 20 sekundēm, kad pulveris ir sakratīts (tas ir nepieciešams lai iegūtu stabilus rezultātus), atver aizbīdņi un novēro pulvera izbiršanu no piltuves uztvērēja glāzē. Kad viss pulveris izbirst no piltuves, hronometru izslēdz.

Birstamību aprēķina pēc formulas:

$$V_b = \frac{M}{t - 20} \quad (5)$$

V_b – birstamība, $\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$;

M – pulvera parauga masa, g;

t – viss pārbaudes laiks, s;

20 – pulvera sakratīšanas laiks, s.

Par analīzes rezultātu pieņem vidējo aritmētisko no piecu paraugu paralēliem mērījumiem. Pulveru birstamībai ir jābūt robežās no 6,6 – 12,0 $\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$.

2.2.7. SBE₂ saturošo mīksto želatīna kapsulu dozēšanas precizitātes noteikšana

No katras preparāta sērijas nejauši atlasa 20 kapsulu. Katru kapsulu nosver uz analītiskiem svariem. Tad katru kapsulu pārgriež, atbrīvo no pildījuma, apvalku izskalo ar hloroformu, žāvē 30 min un nosver. Aprēķina katras kapsulas pildījuma masu. Nosaka kapsulu pildījuma vidējo masu un novirzes no vidējās masas. Katras kapsulas pildījuma masas novirze no pildījuma vidējās masas nedrīkst pārsniegt $\pm 7,5 \%$ [128].

2.2.8. SBE₂ saturošo mīksto želatīna kapsulu sairšanas laika noteikšana

Sairšanas tests nosaka, vai kapsulas sairst noteiktā laikā pēc to ievietošanas šķidrā vidē zemāk minētos eksperimentālajos apstākļos. No katras preparāta sērijas nejauši atlasa 6 kapsulas.

Lai noteiktu kapsulu sairšanas laiku, traukā ielej atbilstošo šķidrumu. Sairšanas vides temperatūra ($37 \pm 0,5$) °C. Šķidruma daudzums ir tāds, lai groziņam atrodotos augstākajā pozīcijā, apakšējais sietiņš būtu vismaz 15 mm zem šķidruma līmeņa, un groziņam atrodotos zemākajā pozīcijā, sietiņš būtu vismaz 25 mm virs trauka dibena un stobriņu augšējās malas paliktu virs šķidruma līmeņa. Katrā stobriņā ievieto kapsulu, groziņu ar stobriņiem ievieto traukā ar šķidrumu, ieslēdz ierīci un ļauj tai darboties noteiktu laiku. Tad groziņu izņem un novērtē kapsulu izskatu. Visām 6 kapsulām jāsairst. Sairšana ir notikusi, ja:

- a) uz sietiņa nav atlikuma; vai
- b) uz sietiņa ir atlikums, kas sastāv no mīkstās masas, kurā nav ar pirkstiem sataustāmas cietās daļiņas vai nesamitrināts kodols; vai
- c) uz sietiņa paliek tikai fragmenti no kapsulas sienas.

Kapsulām jāsairst 30 min laikā ūdens vidē vai mākslīgajā zarnu sulā* [128].

*Mākslīgās zarnu sulas ar pH 6,8 pagatavošana: samaisa 250,0 ml šķidruma, kas satur 6,8 g kālija dihidrogēnfosfāta un 77,0 ml 0,2 M nātrija hidroksīda šķidruma, ar 500 ml ūdens. Pievieno 10,0 g pankreatīna, samaisa un pārbauda pH. Atšķaida līdz 1000,0 ml ar ūdeni.

2.2.9. SBE saturošo preparātu stabilitātes pētījumi

SBE₁ saturošo pulveru sastāvu cietajās želatīna kapsulās stabilitātes pētījumi veikti ilgtermiņā (25 ± 2) °C un paātrinātā glabāšanā (40 ± 2) °C temperatūrā (primārais iepakojums: tumša stikla burkas).

SBE₂ saturošo mīksto želatīna kapsulu stabilitātes pētījumi veikti ilgtermiņā: laboratorijas sērijai un pilotsērijām (25 ± 2) °C temperatūrā (termostatā), ražošanas sērijām

(25 ± 2) °C / (60 ± 5) % RM (klimatokamerā); un paātrinātā glabāšanā: laboratorijas sērijai un pilotsērijām (30 ± 2) °C temperatūrā (termostātā), ražošanas sērijām (30 ± 2) °C / (65 ± 5) % RM (klimatokamerā) [215, 216]. Kapsulas iepakotas divu veidu iepakojumos: 1) augsta blīvuma polietilēna (ABPE) konteineros ar zema blīvuma polietilēna (ZBPE) vākiem; 2) caurspīdīgas, bezkrāsainas PVH plēves un alumīnija folijas (Al/PVH) blisteros.

Sēriju analīze veikta uzreiz pēc pagatavošanas, kā arī ik pēc 3 mēnešiem pirmajā stabilitātes pētījumu gadā un ik pēc 6 mēnešiem otrajā gadā [215, 216].

2.2.10. Datu statistiskā apstrāde

Datu statistiskā analīze veikta izmantojot MS Office Excel 2007 programmu. Pētījuma datiem aprēķināts centrālās tendences rādītājs – vidējais aritmētiskais un izkliedes rādītājs – standartnovirze. Veikta stabilitātes pētījumu datu regresijas analīze [243, 244].

Aprēķinos izmantots lineārās regresijas vienādojums:

$$y = a + bx \quad (6)$$

kur: y – rezultatīvā pazīme (atkarīgais mainīgais);

x – faktoriālā pazīme (neatkarīgais mainīgais);

a – vienādojuma brīvais loceklis;

b – regresijas koeficients.

3. REZULTĀTI

3.1. SBE īpašību izpēte, kvalitātes novērtēšana un karotīnu satura noteikšanas metodes izstrāde SBE dozētā formā

3.1.1. SBE šķīdības noteikšana

Pārbaudīta SBE₁ un SBE₂ šķīdība polāros un nepolāros šķīdinātājos. SBE₁ un SBE₂ brīvi šķīst hloroformā, daļēji šķīst ūdenī, etilspirtā, acetonā, petrolēterī, Nefrāzē [128].

3.1.2. SBE kvalitatīvā sastāva noteikšana ar plānslāņa hromatogrāfijas metodi

SBE sastāvā esošo karotīnu identifikācijai pārbaudītas literatūrā norādītās šķīdinātāju sistēmas, hromatografējot augšupejošā virzienā uz silikagela. Pagatavots 1 % SBE₂ šķīdums hloroformā, par standartu izmantots 1 % β-karotīna šķīdums hloroformā.

Kā piemērotās karotīna atdalīšanai no pārējiem SBE sastāvā esošiem pigmentiem var uzskatīt šķīdinātāju sistēmas Nr. 4, 7, 9, 10, 11 (skat. 5. tab., 12. att.). Šajās sistēmās no pigmentiem virzās tikai karotīns, hlorofila atvasinājumi un citi karotinoīdi paliek uz starta līnijas. Aplūkojot hromatogrammas dienas gaismā redzama oranždzeltenas krāsas zona, kas atbilst β-karotīna pozīcijai ar standarta šķīdumu iegūtajā hromatogrammā. UV gaismā šajā pozīcijā redzama tumši brūnas krāsas zona.

5. tabula. Karotīna identifikācija SBE₂ ar plānslāņa hromatogrāfijas metodi

Nr.	Šķīdinātāji	Attiecība (tilp./tilp.)	Literatūras avots	R _f (vid. ± SD, n=2)	
				SBE ₂ šķīdums hloroformā	β-karotīna standarta šķīdums hloroformā
1.	Benzīns	100 %	[237]	0,03±0	0,03±0
2.	Benzols – etilacetāts	77 : 23	[237, 240]	0,71±0,01	0,74±0
3.	n-Heksāns – ēteris	30 : 70	[237, 240]	1,00±0	1,00±0
4.	n-Heksāns – ēteris	80 : 20	[237, 238]	0,78±0	0,79±0
5.	Hloroforms – etanols	99 : 1	[237, 239]	0,77±0,01	0,79±0,02
6.	Petrolēteris (40 – 80)	100 %	[237, 240]	0,13±0	0,12±0,01
7.	Petrolēteris – acetons	94 : 6	[237, 239]	0,60±0	0,60±0
8.	Petrolēteris – benzols	98 : 2	[237, 239]	0,16±0	0,16±0
9.	Petrolēteris – ēteris	90 : 10	[237]	0,73±0,01	0,73±0
10.	Petrolēteris – ēteris	95 : 5	[237]	0,67±0,02	0,67±0,03
11.	Petrolēteris – hloroforms	75 : 25	[237]	0,90±0	0,89±0,01

Šķīdinātāju sistēmās Nr. 2 un 5 notiek SBE₂ sastāvā esošo pigmentu sadalīšana.

Šķīdinātāju sistēmā benzols-etilacetāts (77 : 23) SBE₂ iegūtajā hromatogrammā dienas gaismā redzamas 4 zonas (skat. 10. att.):

I. oranždzeltenas krāsas zona β-karotīna pozīcijā, R_f = 0,71±0,01 (n=2);

II. zaļas krāsas zona (identificēta kā hlorofils), $R_f = 0,61 \pm 0,01$ ($n=2$);

III. zaļgandzeltenas krāsas zona (iespējams, hlorofila atvasinājumi), $R_f = 0,55 \pm 0$ ($n=2$);

IV. dzeltenas krāsas zona (iespējams, karotinoīdi), $R_f = 0,39 \pm 0$ ($n=2$).

UV gaismā redzamas 7 zonas (skat. 10. att.):

1. tumši brūnas krāsas zona β -karotīna pozīcijā, $R_f = 0,71 \pm 0,01$ ($n=2$);

2. spilgti sārtas fluorescences zona (identificēta kā hlorofils), $R_f = 0,61 \pm 0,01$ ($n=2$);

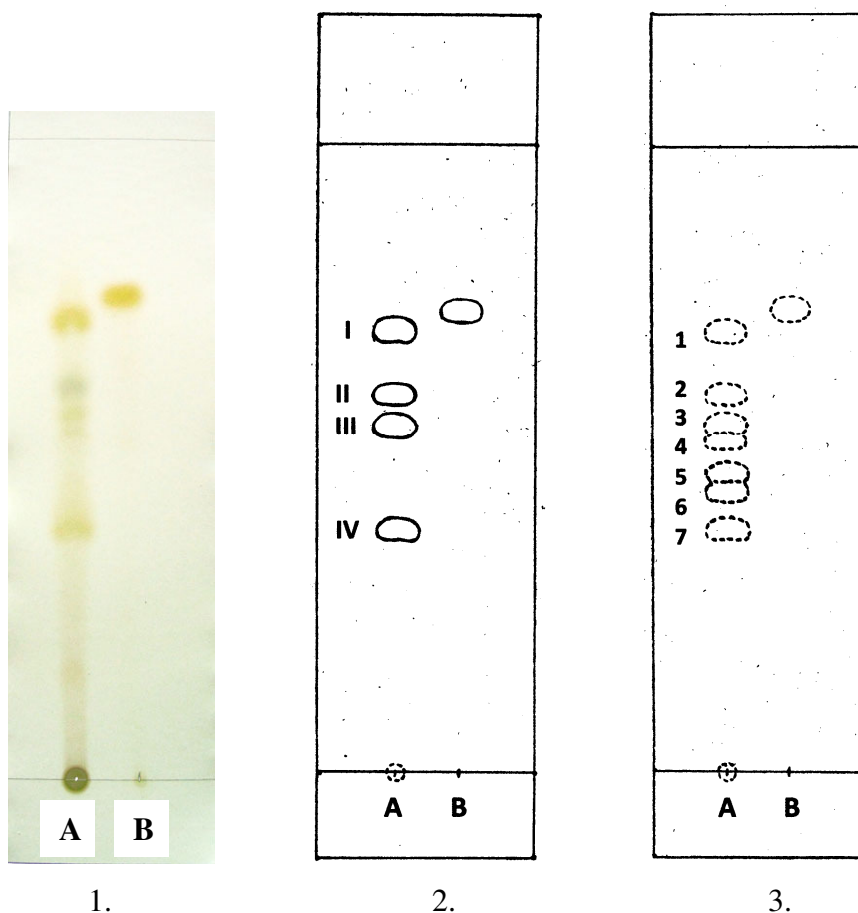
3. sārti-violetas fluorescences zona, $R_f = 0,55 \pm 0$ ($n=2$);

4. sārtas fluorescences zona, $R_f = 0,49 \pm 0,03$ ($n=2$);

5. violetas fluorescences zona, $R_f = 0,47 \pm 0,01$ ($n=2$);

6. sārti-violetas fluorescences zona, $R_f = 0,44 \pm 0,01$ ($n=2$);

7. tumši brūnas krāsas zona, $R_f = 0,39 \pm 0$ ($n=2$).



10. attēls. SBE₂ hromatogrammas šķīdinātāju sistēmā benzols-etilacetāts (77 : 23)

fotoattēls (1) un shēmas (2, 3): A – SBE₂, B – β -karotīna standarts;

1., 2. dienas gaismā redzamās zonas; 3. UV gaismā redzamās zonas.

Šķīdinātāju sistēmā hloroforms-etanols (99 : 1) SBE₂ iegūtajā hromatogrammā dienas gaismā redzamas 3 zonas (skat. 11. att.):

I. oranždzeltenas krāsas zona β -karotīna pozīcijā, $R_f = 0,77 \pm 0,01$ (n=2);

II. zaļas krāsas zona (identificēta kā hlorofils), $R_f = 0,63 \pm 0,01$ (n=2);

III. dzeltenas krāsas zona (iespējams, karotinoīdi), $R_f = 0,37 \pm 0,03$ (n=2).

UV gaismā redzamas 5 zonas (skat. 11. att.):

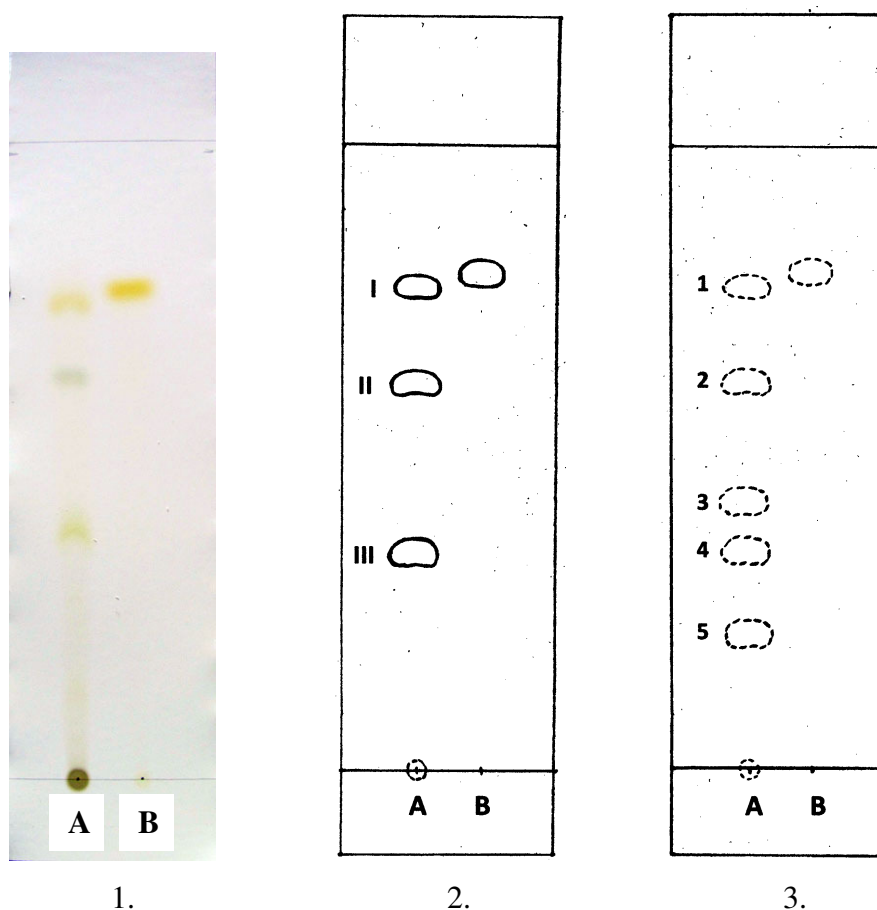
1. tumši brūnas krāsas zona β -karotīna pozīcijā, $R_f = 0,77 \pm 0,01$ (n=2);

2. spilgti sārtas fluorescences zona (identificēta kā hlorofils), $R_f = 0,63 \pm 0,01$ (n=2);

3. gaiši zilas fluorescences zona (iespējams, fenolkarbonskābes), $R_f = 0,46 \pm 0,02$ (n=2);

4. sārti-violetas fluorescences zona, $R_f = 0,37 \pm 0,03$ (n=2);

5. violetas fluorescences zona, $R_f = 0,25 \pm 0,04$ (n=2).

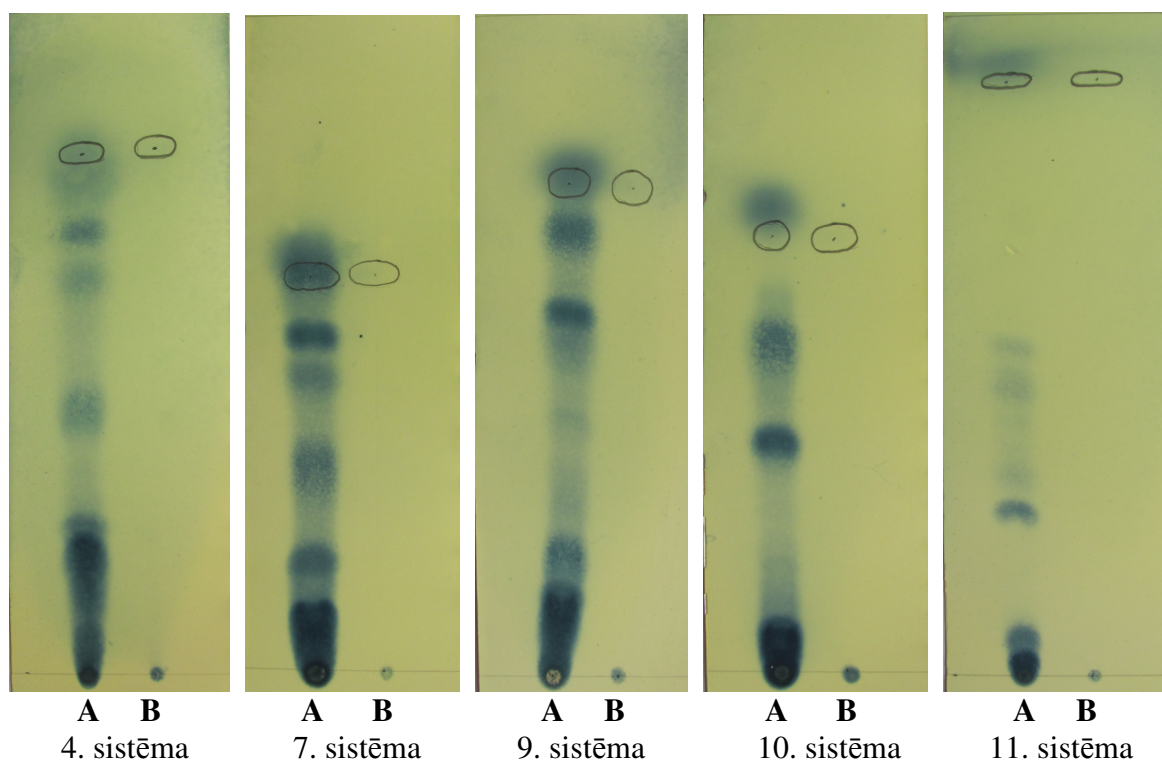


11. attēls. SBE₂ hromatogrammas šķīdinātāju sistēmā hloroforms-etanols (99 : 1)

fotoattēls (1) un shēmas (2, 3): A – SBE₂, B – β -karotīna standarts;

1., 2. dienas gaismā redzamās zonas; 3. UV gaismā fluorescējošās zonas.

Karotinoīdu zonu attīstīšanai visas hromatogrāfijas plates apstrādātas ar 10 % fosformolibdēnskābes etilspirta šķīdumu un sildītas (60 – 80) °C temperatūrā 5 min. Apskatot dienas gaismā, SBE₂ hromatogrammās ir redzamas zilas krāsas zonas uz dzeltenzaļa fona β-karotīna pozīcijā, kā arī citās pozīcijās (skat. 12. att.). Var uzskatīt, ka šī reakcija ar fosformolibdēnskābi nav specifiska, un nav nepieciešama hromatogrammu papildus attīstīšanai, it īpaši tāpēc, ka karotīni labi identificējami pēc krāsas, apskatot dienas gaismā.



12. attēls. SBE₂ hromatogrammas šķīdinātāju sistēmās Nr. 4, 7, 9, 10, 11 pēc apstrādes ar 10 % fosformolibdēnskābes etilspirta šķīdumu:

A – SBE₂, B – β-karotīna standarts.

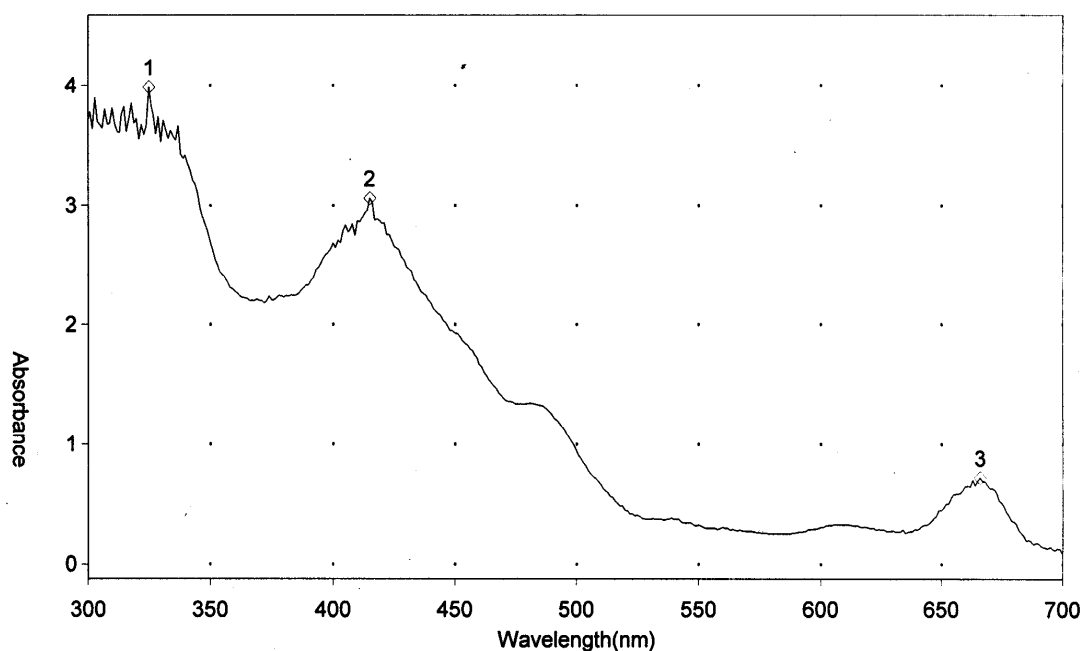
Sistēmas: 4. n-heksāns – ēteris (80 : 20); 7. petrolēteris – acetons (94 : 6);

9. petrolēteris – ēteris (90 : 10); 10. petrolēteris – ēteris (95 : 5);

11. petrolēteris – hlороforms (75 : 25).

3.1.3. SBE kvalitatīvā sastāva noteikšana ar kolonnas hromatogrāfijas un UV/VIS spektrofotometrijas metodi

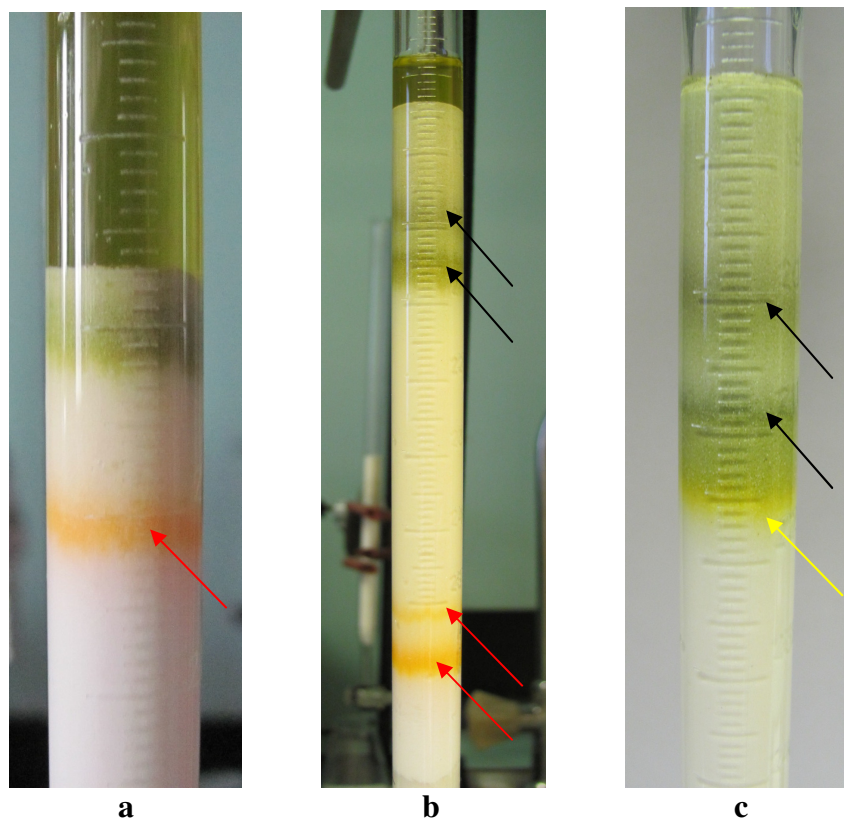
Pirms kolonnas hromatogrāfijas veikšanas, uzņemts 0,5 % SBE₂ šķīduma hlороformā gaismas absorbcijas spektrs viļņu garumā 300 – 700 nm (galvenie λ_{max} 415 nm un 666 nm) (skat. 13. att.).



13. attēls. SBE₂ 0,5 % šķīduma hloroformā gaismas absorbcijas spektrs viļņu diapazonā 300 – 700 nm

Ir zināms, ka viļņu diapazonā 400 – 700 nm notiek augu pigmentu: hlorofila *a* un *b*, to atvasinājumu un karotinoīdu gaismas absorbcija [245]. Hlorofiliem ir divi absorbcijas diapazoni: I – 400 – 500 nm un II – 600 – 700 nm, bet karotinoīdiem – viens diapazons 400 – 500 nm [82].

Izmantojot alumīnija oksīda hromatogrāfijas kolonnu, SBE₂ sastāvā esošie pigmenti tiek sadalīti. Eluējot caur kolonnu SBE₂ šķīdumu Nefrāzē (sagatavots atbilstoši p.2.2.5.1.), karotīni, kā mazāk polāri savienojumi, virzās lejup pa kolonnu (skat. 14. att., a), pie kam var redzēt, ka pirmie eluējas oranždzeltenas krāsas karotīni (t.sk. β-karotīns), tiem seko spilgti dzeltenas krāsas karotīni un to atvasinājumi (skat. 14. att., b). Citi karotinoīdi (t.sk. ksantofili), spilgti gaiši dzeltenas krāsas joslā, kā vairāk polāri, paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem, kurus arī pārstāv vairāki savienojumi (skat. 14. att. c) [238, 241].

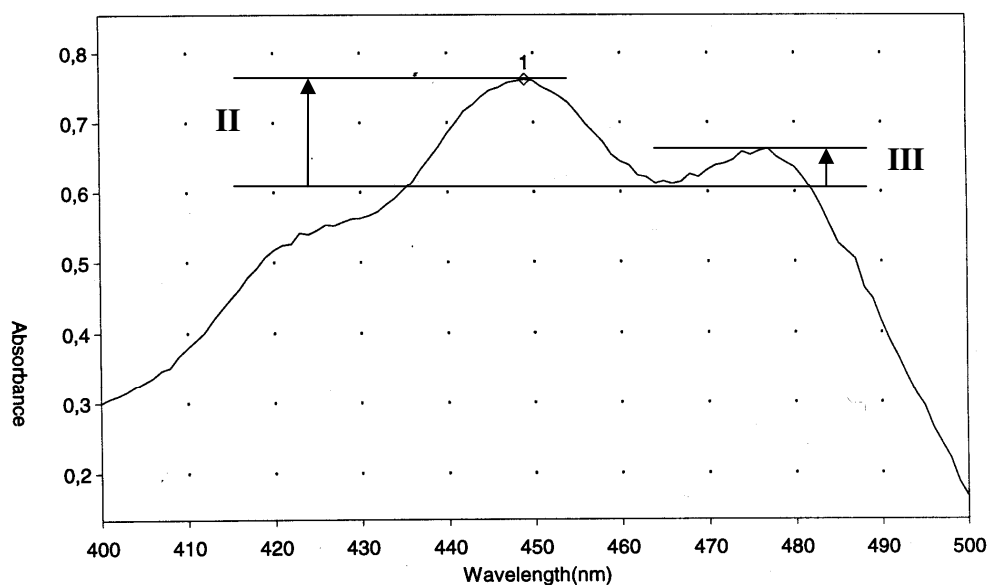


14. attēls. SBE₂ kolonnas hromatogrāfija uz alumīnija oksīda, eluējot ar Nefrāzi:

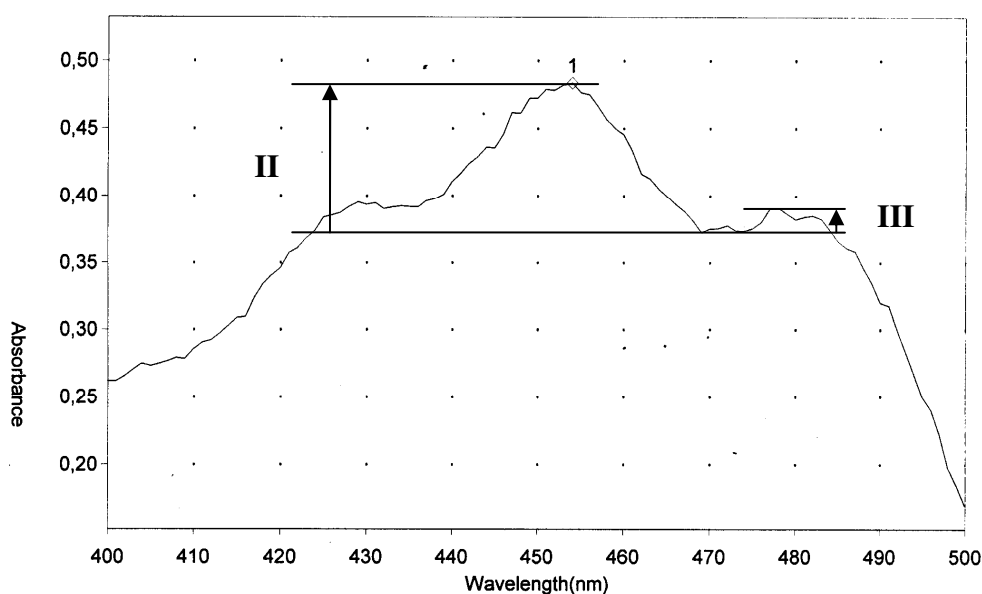
a, b – karotīni virzās lejup pa kolonnu —→ ;

c – karotinoīdi (t.sk. ksantofili) paliek kolonnas augšdaļā —→ zem hlorofiliem —→ .

Iegūtā Nefrāzes eluāta (1. frakcija) gaismas absorbcijas spektrs redzams 15. att.: $\lambda_{\max}$ 449 un 477 nm, plecs pie 425 nm, %III/II = 34,5. Šie dati ir ļoti tuvi literatūrā norādītajam β -karotīna spektram: $\lambda_{\max}$ 450 un 477 nm, plecs pie 425 nm; %III/II = 25 (petrolēterī) [70, 246]; $\lambda_{\max}$ 425, 449 un 476 nm (petrolēterī) [71, 247], un klāt varētu būt α -karotīns: $\lambda_{\max}$ 422, 445, 473 nm, %III/II=55 (petrolēterī) [70]; $\lambda_{\max}$ 422, 444 un 473 nm (petrolēterī) [56, 71]. Iegūtais gaismas absorbcijas spektrs ir līdzīgs izmantotā β -karotīna standarta absorbcijas spektram ($\lambda_{\max}$ ~429, 454, ~478 nm, %III/II = 17,3 (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Nefrāze) (16. att.).



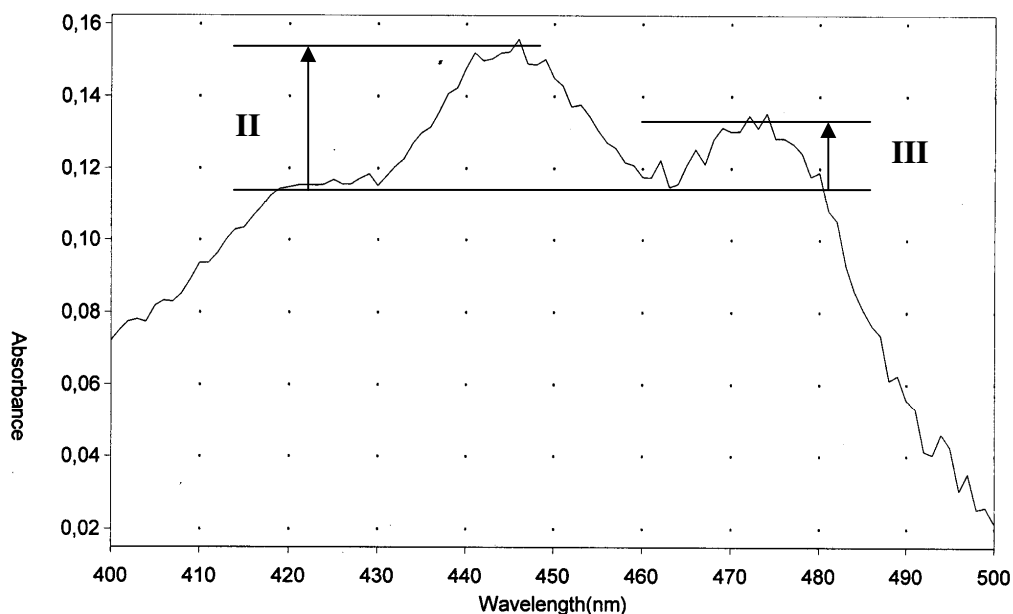
15. attēls. SBE₂ ar Nefrāzi iegūtā eluāta (1. frakcija) gaismas absorbcijas spektrs pēc kolonnas hromatogrāfijas uz alumīnija oksīda



16. attēls. β -karotīna standarta šķīduma ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) absorbcijas spektrs

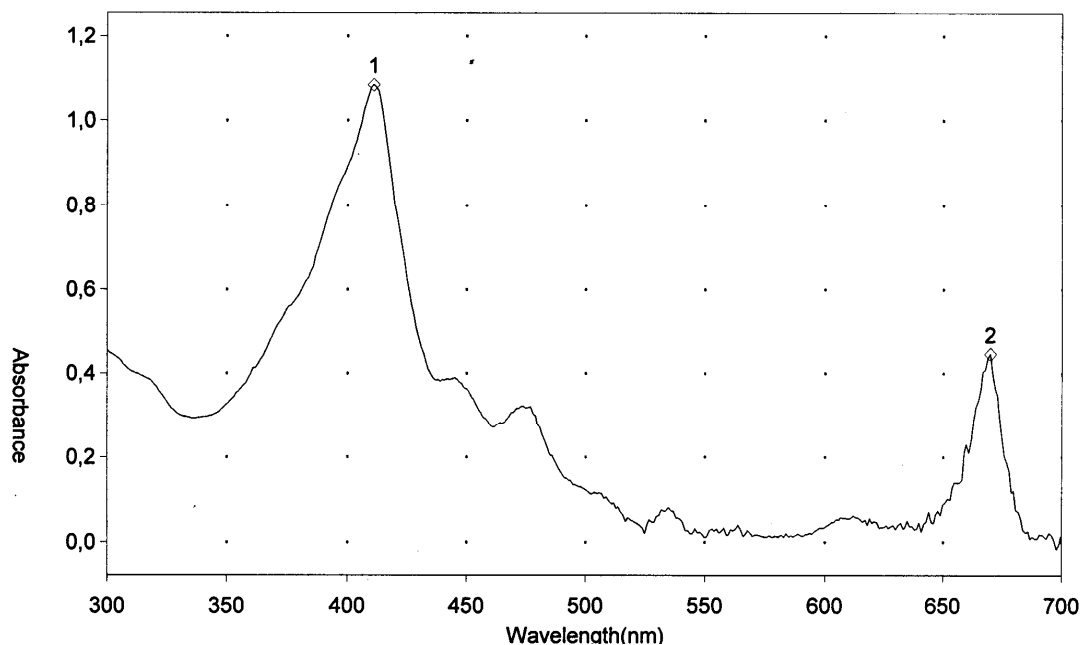
Pēc karotīnu eluēšanas, caur kolonnu ar Nefrāzi eluēti gaiši dzeltenie pigmenti, kuri atrodas kolonnā zem hlorofiliem. Šo pigmentu eluēšana notiek ļoti lēni, iegūtās 2. frakcijas gaismas absorbcijas spektrs ir redzams 17. att. Šis spektrs ir ļoti līdzīgs 1. frakcijas spektram: $\lambda_{\text{max}} \sim 446$ un ~ 474 nm, plecs pie 425 nm; $\% \text{III/II} = 48,5$. Var izteikt pieņēmumu, ka šie, iespējams, ir ksantofili, piem., luteīns ($\lambda_{\text{max}} 421, 445, 474$ nm; $\% \text{III/II} = 60$, petrolēterī) [56,

70, 71], β -kriptoksantīns ($\lambda_{\max}$ 425 (plecs), 449, 476, %III/II = 25, petrolēterī) [67, 70, 71], zeaksantīns ($\lambda_{\max}$ 424 (plecs), 449, 476, %III/II = 25, petrolēterī) [70, 71] un anteraksantīns ($\lambda_{\max}$ 422, 445, 472 nm; %III/II = 60, petrolēterī) [70], ($\lambda_{\max}$ 423, 444, 473 nm, petrolēterī) [71].



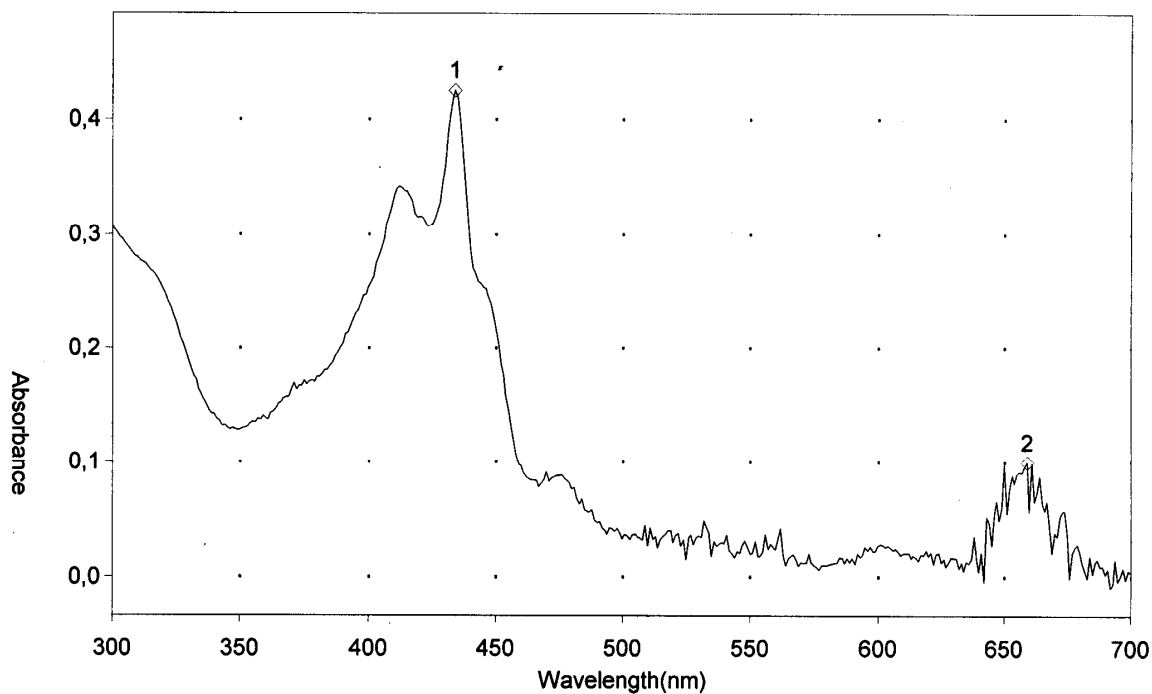
17. attēls. SBE₂ eluāta 2. frakcijas spektrs pēc eluēšanas ar Nefrāzi caur alumīnija oksīda kolonnu

Turpinot gaiši dzeltenu pigmentu eluēšanu ar Nefrāzi, kurai pievienoti 5 % dietilētera, eluēšana notiek ātrāk, un šīs frakcijas eluāta krāsa ir spilgti dzeltena (citronkrāsas). Iegūtās 3. frakcijas gaismas absorbcijas spektrs redzams 18. att., kas liecina, ka eluāts satur hlorofilu atvasinājumus ($\lambda_{\max}$ 411 un 670 nm) [248] un karotinoīdus ($\lambda_{\max}$ ~445 un ~470 nm) [70].



18. attēls. SBE₂ eluāta 3. frakcijas spektrs pēc eluēšanas ar Nefrāzi, kas satur 5 % dietilētera, caur alumīnija oksīda kolonnu

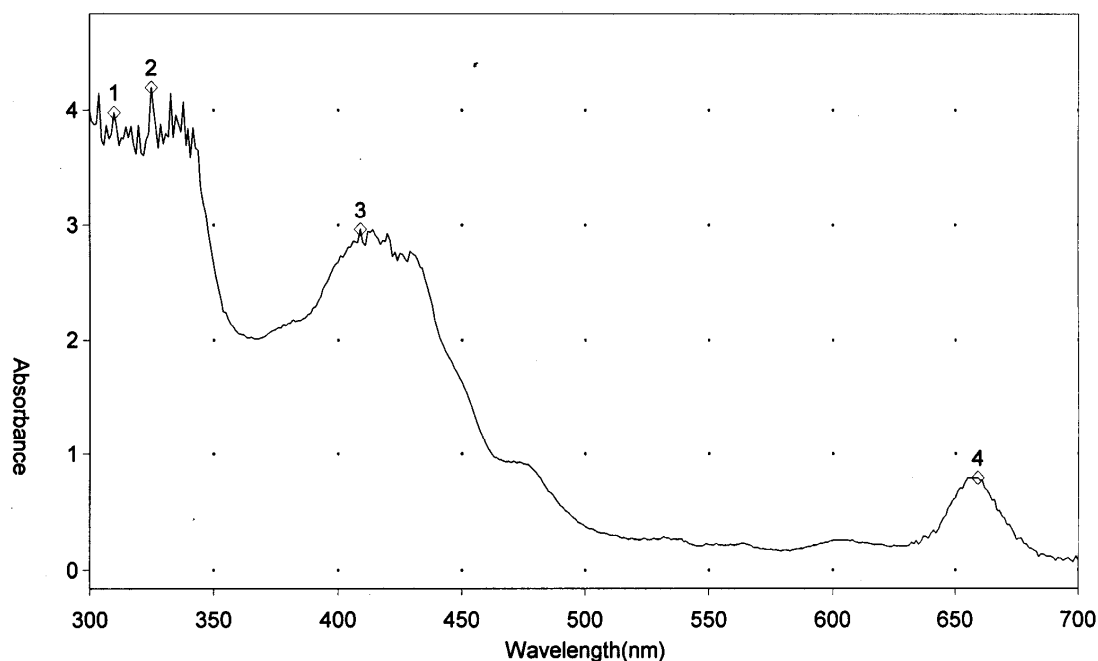
Pievienojot Nefrāzei 10 % dietilētera, iegūta 4. frakcija zaļgandzeltenā krāsā, kuras absorbcijas spektrs redzams 19. attēlā. Šī frakcija arī satur gan hlorofilus un to atvasinājumus, gan karotinoīdus (λ_{max} ~413, 434, ~445, ~475, ~600, 659 nm) [70, 248].



19. attēls. SBE₂ eluāta 4. frakcijas spektrs pēc eluēšanas ar Nefrāzi, kas satur 10 % dietilētera, caur alumīnija oksīda kolonnu

Salīdzinot ar literatūras datiem, var izteikt pieņēmumu, ka 3. un 4. frakcijas savienojumi, iespējams, ir hlorofils *a* ($\lambda_{\max}$ 412, 429, 662 nm (petrolēterī) [248], ($\lambda_{\max}$ 430, 662 nm (dietilēterī) [245]; feofitīns *a* ($\lambda_{\max}$ 408, 667 nm (dietilēterī) [245, 248]; $\lambda_{\max}$ 409, 667 nm [56, 249], feoforbīds *a* ($\lambda_{\max}$ 408, 667 nm (dietilēterī) [245, 248]; ($\lambda_{\max}$ 410, 667 nm [56, 249]), violaksantīns ($\lambda_{\max}$ 416, 440, 465, %III/II = 98, petrolēterī) [56, 70, 71] un neoksantīns ($\lambda_{\max}$ 416, 438, 467, %III/II = 87, petrolēterī) [70, 71].

Pēdējā 5. frakcija iegūta, eluējot ar Nefrāzi, kurai pievienoti 10 % acetona. Frakcijas krāsa ir dzeltenīgi zaļa, un šī frakcija satur galvenokārt hlorofilu atvasinājumus (galvenie $\lambda_{\max}$ 409 un 659 nm) (skat. 20. att.) [245, 248, 250].



20. attēls. SBE₂ eluāta 5. frakcijas spektrs pēc eluēšanas ar Nefrāzi, kas satur 10 % acetona, caur alumīnija oksīda kolonnu

Kopumā var secināt, ka ar kolonnas hromatogrāfijas metodi, izmantojot alumīnija oksīdu kā sorbentu un Nefrāzi kā eluentu, var sekmīgi atdalīt karotīnus no pārējiem SBE₂ sastāvā esošiem pigmentiem: hlorofiliem un to atvasinājumiem, karotinoīdiem un citiem komponentiem.

3.1.4. Pētījumā izmantoto SBE sēriju kvalitātes novērtēšana

Pētījumā izmantoto SBE sēriju kvalitāte pārbaudīta atbilstoši Farmakopejas priekšraksta FP 95-0002/42-26-95 „Fitestens” (skat. 6. tab.) un LV UTN 000312820-18-2008 „Skuju biežais ekstrakts” (skat. 7. tab.) prasībām.

6. tabula. Pētījumā izmantoto SBE₁ sēriju kvalitātes rādītāji

Rādītāja nosaukums	Prasības	1. sērija	2. sērija
Ārējais izskats, krāsa, smarža, garša (2.2.1.)	Bieza tumši zaļa masa ar skuju smaržu un rūgtu garšu	atbilst	atbilst
Identitāte: - hlorofils (2.2.2.1.) - karotinoīdi (2.2.2.2., 2.2.2.3.)	atbilst atbilst	atbilst atbilst	atbilst atbilst
Masas zudums žāvējot, % (2.2.3.) [vid.±SD, n = 3]	NVP 40,0	38,71±0,49	31,93±0,55
Karotīnu saturs sausā produktā, mg % (2.2.5.1.) [vid.±SD, n = 3]	NMP 30,00	45,47±1,09	32,34±1,57

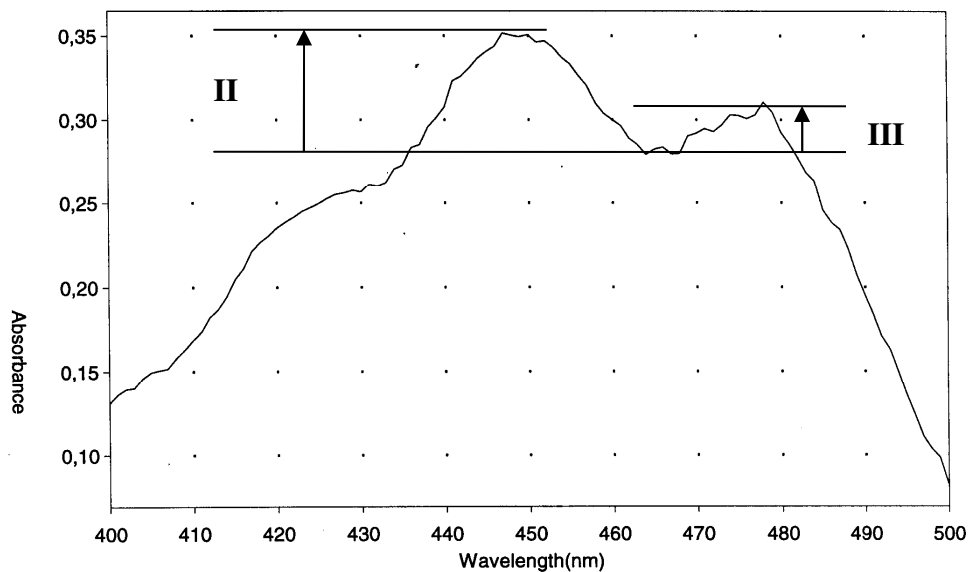
7. tabula. Pētījumā izmantoto SBE₂ sēriju kvalitātes rādītāji

Rādītāja nosaukums	Prasības	1. sērija	2. sērija	3. sērija	4. sērija
Ārējais izskats, krāsa, smarža, garša (2.2.1.)	Bieza masa no olīvzaļas līdz tumši zaļai krāsai ar vāju, specifisku skuju smaržu un rūgtu garšu	atbilst	atbilst	atbilst	atbilst
Identitāte: - hlorofils (2.2.2.1.) - karotinoīdi un nepiesātinātie ogļūdeņraži (2.2.2.2.)	atbilst atbilst	atbilst atbilst	atbilst atbilst	atbilst atbilst	atbilst atbilst
Masas zudums žāvējot, % (2.2.3.) [vid.±SD, n = 3]	NVP 10,0	8,54±0,65	8,90±0,30	10,86±0,44	10,81±0,67
Ūdeņraža eksponents (pH) (2.2.4.) [vid.±SD, n = 3]	8,0 – 9,0	8,88±0,03	8,47±0,03	8,87±0,06	8,70±0,05
Karotīnu saturs sausā produktā, mg % (2.2.5.2.) [vid.±SD, n = 3]	NMP 30,00	34,76±0,46	39,45±0,93	44,35±0,93	38,34±1,14

3.1.5. Karotīnu summas SBE₂ MŽK kvantitatīvās noteikšanas metodes pamatojums

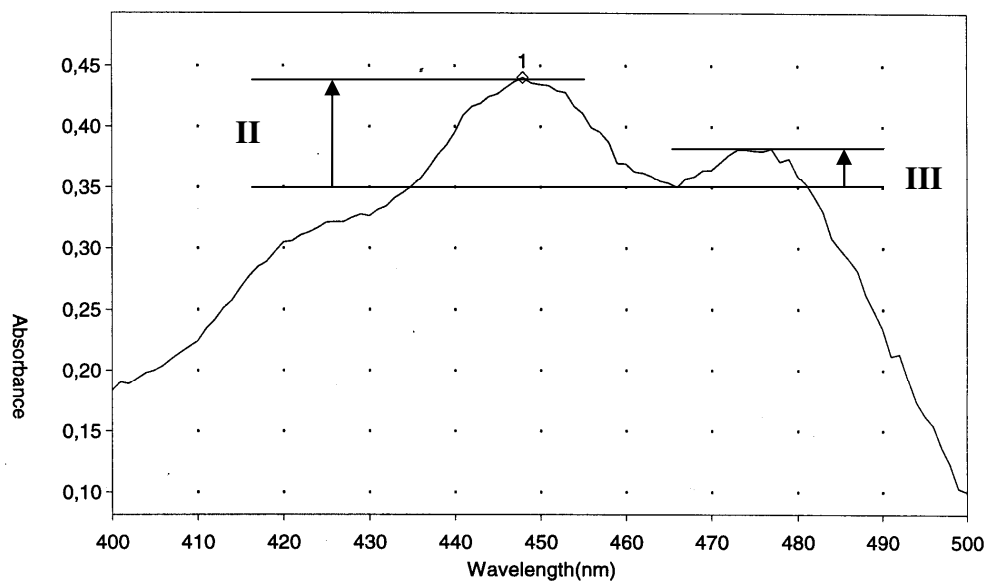
Izstrādājot karotīnu summas kvantitatīvās noteikšanas metodi SBE₂ MŽK, bija nepieciešams pārliecināties, ka, izdarot izmaiņas esošajā karotīnu summas kvantitatīvās noteikšanas metodē (p.2.2.5.1.), tiek izekstraģēti līdzvērtīgi komponenti, un hromatografējot caur kolonnu tiek iegūts līdzvērtīgs eluāts. Šim nolūkam veikta ar abām metodēm iegūto paraugu eluātu gaismas absorbcijas spektru uzņemšana.

SBE₂ MŽK karotīnus saturošā eluāta, kas iegūts pēc p.2.2.5.1. aprakstītās metodes, absorbcijas spektrs redzams 21. att.: $\lambda_{\max}$ 447 un 477 nm, plecs pie 425 nm, %III/II = 37,5.



21. attēls. SBE₂ MŽK karotīnus saturošā eluāta, kas iegūts pēc p.2.2.5.1. aprakstītās metodes, absorbcijas spektrs

SBE₂ MŽK karotīnus saturošā eluāta, kas iegūts pēc modificētas metodes, absorbcijas spektrs redzams 22. att.: $\lambda_{\max}$ 448 un 477 nm, plecs pie 425 nm; %III/II = 35,7.



22. attēls. SBE₂ MŽK karotīnus saturošā eluāta, kas iegūts pēc modificētas metodes, absorbcijas spektrs

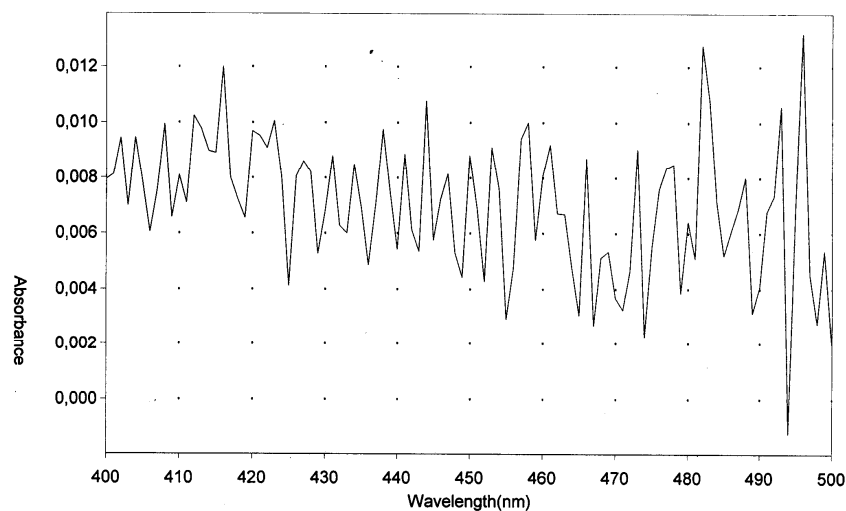
Uzņemtie spektri uzrāda analogisku maksimumu skaitu un vienu galveno maksimumu apmēram 450 nm viļņa garumā. Iegūtie rezultāti liecina, ka oficiāli apstiprinātajā un modificētajā karotīnu satura noteikšanas metodē iegūtie paraugu eluāti ir līdzvērtīgi.

3.1.6. Karotīnu summas SBE₂ MŽK kvantitatīvās noteikšanas metodes validācija

Specifiskums

Apstiprinājums, ka *placebo* (saulespuķu eļļa ar 5 % emulgatora glicerīna monooleāta) neietekmē analīzes rezultātu, uzņemot *placebo* šķīduma absorbcijas spektru viļņu garumu diapazonā no 400 nm līdz 500 nm un nosakot tā gaismas absorbcijas lielumu preparāta analizējamā šķīduma absorbcijas maksimumā viļņa garumā 450 nm.

Rezultāts: Metode ir specifiska, jo *placebo* šķīduma gaismas absorbcija 450 nm viļņa garumā ir nenoīmīga: $A_{\text{vid.}} \approx 0,00275$; *placebo* šķīduma spektrs ir redzams 23. attēlā.



23. attēls. *Placebo* šķīduma spektrs

Precizitāte (rezultātu atkārtojamība)

Izmantojot modificēto karotīnu satura noteikšanas metodi, analizēti paraugi no vienas SBE₂ MŽK sērijas. Analīzes rezultāti redzami 8. tabulā. Aprēķinātā relatīvā standartnovirze norāda, ka metodei ir akceptējams precizitātes līmenis: RSD = 1,58 %.

8. tabula. Metodes precizitāte

Parauga Nr.	Karotīnu saturs, mg %	Karotīnu saturs, µg kapsulā
1.	34,68	92,79
2.	34,88	93,34
3.	35,19	94,18
4.	35,34	94,56
5.	35,73	95,59
6.	35,75	95,67
7.	35,94	96,17
8.	36,35	97,27
Vidējā vērtība	35,4825	94,94625
Standartnovirze (SD)	0,561573	1,502445
Relatīvā standartnovirze (RSD), %	1,58	1,58

Pareizība

Veikta aktīvās vielas atgūstamības vidējā lieluma noteikšana un RSD novērtēšana, analizējot 9 mākslīgo maisījumu paraugus, kuri pagatavoti no SBE₂ un *placebo* ar aktīvās vielas saturu apmēram 80, 100 un 120 % no SBE₂ satūra kapsulā.

Analīzes rezultāti ir redzami 9. tabulā. Karotīnu atgūstamības vidējais lielums ($103,72 \pm 1,43$) % iekļaujas robežās (95 – 105) %, RSD = 1,37 %.

9. tabula. Metodes pareizība

Parauga Nr.	Ņemts analīzei				Karotīnu atgūstamība	
	SBE ₂ , mg	<i>placebo</i> , mg	SBE ₂ saturs mākslīgā maisījuma iesvarā, %	Karotīnu saturs iesvarā, µg	µg	%
1.	201,05	301,35	80	62,51	64,94	103,89
2.	201,13	301,47	80	62,53	64,34	102,89
3.	201,25	301,65	80	62,57	63,33	101,21
4.	250,66	250,74	100	77,93	81,74	104,89
5.	250,96	251,04	100	78,02	79,92	102,44
6.	251,31	251,39	100	78,13	81,54	104,36
7.	299,81	200,29	120	93,21	98,53	105,71
8.	300,71	200,89	120	93,49	98,13	104,96
9.	300,89	201,01	120	93,55	96,51	103,16
Vidējā vērtība						103,7233
Standartnovirze (SD)						1,425044
Relatīvā standartnovirze (RSD), %						1,37

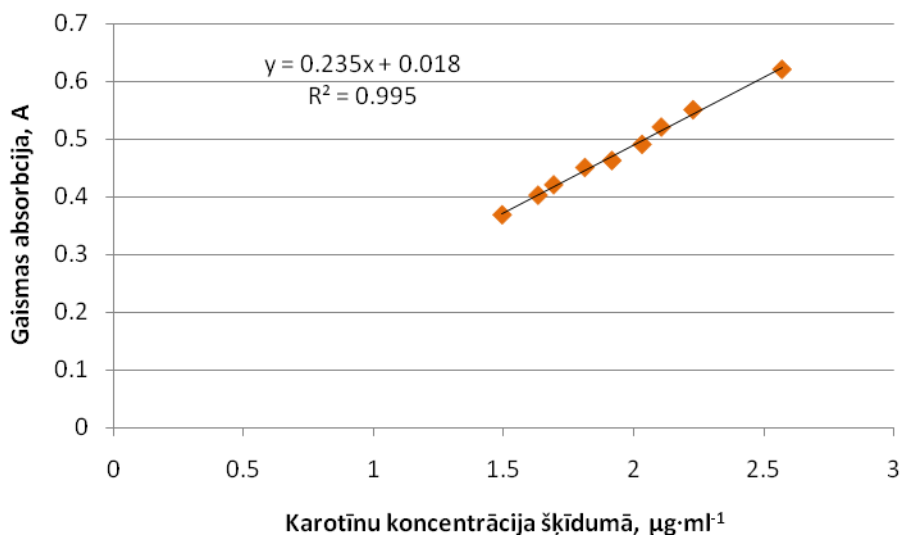
Linearitāte

Apstiprinājums lineārai sakarībai starp gaismas absorbciju un aktīvās vielas koncentrāciju šķīdumā diapazonā aptuveni (75 – 130) % no aktīvās vielas darba koncentrācijas $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Rezultāts: lineārai sakarībai starp gaismas absorbciju un aktīvās vielas koncentrāciju šķīdumā nav gadījuma raksturs: $R^2 = 0,995$, $r = 0,998$ ($r > 0,99$) (skat. 10. tab. un 24. att.).

10. tabula. Gaismas absorbcijas atkarība no karotīnu koncentrācijas šķīdumā

Parauga Nr.	Karotīnu koncentrācija šķīdumā attiecībā pret darba koncentrāciju, %	Karotīnu koncentrācija šķīdumā, C, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Gaismas absorbcija, A
1.	74,6	1,492	0,368
2.	81,5	1,630	0,402
3.	84,5	1,690	0,420
4.	90,5	1,810	0,450
5.	95,7	1,914	0,462
6.	101,5	2,030	0,490
7.	105,2	2,104	0,520
8.	111,3	2,226	0,550
9.	128,4	2,568	0,620
Determinācijas koeficients (R^2)			0,995
Korelācijas koeficients (r)			0,997594



24. attēls. Gaismas absorbcijas atkarība no karotīnu koncentrācijas šķīdumā

3.2. Palīgvielu un tehnoloģisku paņēmieni pielietošanas iespējas izpēte SBE dozētas formas izveidošanai

3.2.1. SBE₁ saturošu pulveru sastāvu pildīšanai cietajās želatīna kapsulās tehnoloģijas izstrāde

Lai izveidotu SBE dozētu formu, pārbaudīta iespēja pagatavot SBE₁ saturošus pulverveida sastāvus pildīšanai cietajās želatīna kapsulās.

Darbā izmēģināti divi varianti pulverveida masas pagatavošanai:

I variants: ekstrakta samaisīšana ar neorganiskām aktīvām vielām, augu ekstraktiem un palīgvielām.

II variants: ekstrakta samaisīšana ar pārtikā lietojamām kviešu klijām.

3.2.1.1. SBE₁ saturošu pulveru sastāvu I variantā pagatavošana

Kombinētā pulverveida preparāta iegūšanai izmantotas 2. tabulā uzrādītās aktīvās vielas un palīgvielas (1. – 6.). Kopumā pagatavoti 27 kombinētā pulvera ar SBE₁ paraugi, kuri vērtēti organoleptiski pēc ārējā izskata un konsistences (skat. 3. pielikumu). 11. tabulā parādīti 10 sastāvi, kuri uzrādīja salīdzinoši labākas īpašības, vērtējot vizuāli un pēc konsistences.

Optimālas īpašības uzrādīja 9. sastāvs, kas saturēja SBE₁ 1 daļu, magnija oksīdu 1,5 daļu un kalcija karbonātu 1,5 daļu, ar šīm sastāvdaļām tika iegūts sauss, birstošs pulveris. Pie kam, šajā sastāvā ir komponenti ar antacīdām īpašībām. Šis sastāvs izmantots tālākos pētījumos. Pēc gastroenterologu ieteikuma kombinētā preparāta iegūšanai sastāvam pievienots bismuta subnitrāts 1 daļa, lai uzlabotu antacīdās, antiseptiskas un pretčūlu īpašības (10. sastāvs).

11. tabula. I variantā SBE₁ saturošu pulveru sastāvi

Vielas nosaukums un daudzums, masas daļas	Sastāva Nr.									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SBE ₁	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Laktoze	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-
Lakricas sausais ekstrakts	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Alumīnija hidroksīds	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Magnija oksīds	-	-	1,5	2	-	1	1	1,25	1,5	1,5
Kalcija karbonāts	-	-	-	-	5	-	1	1,25	1,5	1,5
Bismuta subnitrāts	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

Lai atvieglotu SBE₁ samaisīšanos ar pulveriem, ekstrakts tika atšķaidīts ar 96 % etilspirtu attiecībā 1 : 0,5 un 1 : 1, attīrītu ūdeni attiecībā 1 : 1, kā arī ar 1 % tvina-80 ūdens šķīdumu attiecībā 1 : 1. Pulveru paraugu iegūšanai izmantots maisītājs ar trim lāpstiņām (maisīšanas ātrums 120 apgr.·min⁻¹) un apsildāmu tvertni. No 4 iegūtiem paraugiem tika izvēlēts sastāvs, kuru ieguva, atšķaidot SBE₁ ar 1 % tvina-80 ūdens šķīdumu, jo virsmas aktīvās vielas pievienošana atviegloja pulveru un SBE₁ samaisīšanas procesu.

SBE₁ saturoša pulverveida preparāta iegūšanas tehnoloģija:

1. SBE₁ atšķaida ar 1 % tvina-80 ūdens šķīdumu attiecībā 1 : 1.
2. Pastāvīgi maisot, pievieno magnija oksīdu, tad kalcija karbonātu un bismuta subnitrātu. Maisa, līdz iegūst viendabīgu masu.
3. Mitru masu žāvē žāvējamā skapī temperatūrā (40 – 50) °C.
4. Pulveri sijā caur sietu ar atveru lielumu 1 mm.
5. Iegūto sauso birstošo pulveri pilda pa 250 mg cietajās želatīna kapsulās Nr. 0 un pakotumša stikla burkā pa 50 kapsulām.

Pārbaudot karotīna saturu pagatavotā I variantā kompleksā preparāta sērijām eksperimentālā derīguma laika noteikšanā, konstatēts, ka samazinās karotīna saturs preparātā (skat. 12. tab).

12. tabula. I varianta SBE₁ saturoša pulveru sastāva Nr. 10 karotīnu saturs stabilitātes pētījuma laikā

Uzglabāšanas laiks	Karotīnu saturs, mg % [vidējā vērtība ± SD (n = 3)]			
	uzglabāšanas apstākļi (25 ± 2) °C		uzglabāšanas apstākļi (40 ± 2) °C	
	1. sērija	2. sērija	1. sērija	2. sērija
Pirms uzglabāšanas	37,28±0,55	36,17±0,43	37,28±0,55	36,17±0,43
1 mēnesis	16,09±0,67	12,25±0,68	9,45±0,34	8,36±0,74
2 mēneši	5,64±0,97	4,64±1,08	0	0

Vizuālā kontrole uzrāda, ka SBE₁ saturoša pulveru sastāva Nr. 10 un pārējo sastāvu Nr. 1 – 9, kuri uzrādīti 11. tabulā, pulveru krāsa mainās no zaļganās uz pelēku. Tas, iespējams, saistīts ar karotīnu un hlorofilu oksidēšanās procesiem un iespējamām mijiedarbības reakcijām starp SBE₁ komponentiem un pārējām sastāva vielām.

Sakarā ar augstākminēto, lai pagatavotu stabilu SBE₁ dozētu formu, tika izveidoti pulveru sastāvi ar antioksidantu (skat. 13. tab.).

13. tabula. I varianta SBE₁ saturošu pulveru sastāvi ar antioksidantu

Vielas nosaukums un daudzums, masas daļas	Sastāva Nr.			
	11	12	13	14
SBE ₁	10	10	10	10
Magnija oksīds	15	15	15	20
Kalcija karbonāts	15	15	15	-
Bismuta subnitrāts	10	-	-	-
Tvins-80	0,1	0,1	-	-
Nātrija metabisulfīts	0,25	0,2	0,2	0,2
Karotīnu saturs pēc pagatavošanas, mg % [vidējā vērtība ± SD (n = 3)]	35,33±0,65	37,74±0,32	37,85±0,25	38,07±0,42

Veicot pagatavoto sastāvu standartizāciju, konstatēts, ka pulveru glabāšanas laikā (pēc 6 mēnešiem) karotīnu saturu visos sastāvos nevarēja noteikt. Pulveru krāsa mainījās no zaļganās uz pelēku. Var secināt, ka antioksidanta (nātrija metabisulfīta) pievienošana koncentrācijā līdz 0,5 % nav uzlabojusi SBE₁ saturošo pulveru stabilitāti.

3.2.1.2. SBE₁ saturošu pulveru sastāvu II varianta pagatavošana

SBE₁ saturošas pulverveida masas iegūšanas tehnoloģijas izstrādei eksperimentāli precizēti: 1) palīgvielas – kliju smalkuma pakāpe (nesijātas klijas, klijas sijātas caur sietu ar atveru diametru 1 mm); 2) SBE₁ maisījuma ar klijām attiecība 1 : 5 un 1 : 10.

Tā kā pagatavoto pulveru sastāvu kvalitāte bija līdzīga, vērtējot organoleptiski un pēc konsistences, tika izmantots frakcionēts sastāvs ar daļiņu lielumu līdz 1 mm un ar mazāku kliju saturu (1 : 5).

SBE₁ ar klijām maisījuma 1 : 5 pagatavošanas tehnoloģiskais process un starpstadiju kontrole:

1. Izejmateriālu – SBE₁ un kliju sagatavošana.
2. Izejmateriālu svēršana (masas kontrole).
3. SBE₁ uzsildīšana līdz 40 °C temperatūrai (temperatūras kontrole).
4. SBE₁ un kliju samaisīšana. Ekstrakta pievienošanas režīms – 5 min laikā 1,15 kg · min⁻¹, maisījuma sasildīšana līdz temperatūrai (115 – 120) °C, maisīšanas ilgums 25 min. (Stadijas kontrole: ekstrakta pievienošanas ātrums, daudzums, masas temperatūra, masas mitrums – (10 – 12) %).
5. Galaprodukta atdzesēšana un pakošana polietilēna maisos (gatavā produkta kvalitātes pārbaude).

Pagatavotam SBE₁ un kliju pulvera (1 : 5) maisījumam pārbaudīta birstamība pirms pildīšanas cietajās želatīna kapsulās. SBE₁ saturošas pulverveida masas (daļiņu lielums 1 mm) birstamība ir 0,96 g · s⁻¹, pulveris birst nevienmērīgi, slikti.

Lai būtu iespējams pulveri pildīt cietajās želatīna kapsulās, bija nepieciešams uzlabot tā birstamību. Šim nolūkam SBE₁ pulverveida masai pievienotas granulu un tablešu tehnoloģijā plaši lietojamās slīdvielas, kā arī izmantots šo slīdvielu maisījums (skat. 14. tab.).

Ar slīdvielu palīdzību izdevās paaugstināt SBE₁ un kliju pulverveida masas birstamību. Labākus rezultātus uzrādīja 10. sastāvs (7,4 g · s⁻¹) (skat. 14. tab.).

14. tabula. II variantā SBE₁ un kliju (1 : 5) pulveru sastāvu ar slīdvielām birstamība

Slīdviela, daudzums, %	Sastāva Nr.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Magnija stearāts	-	0,5	1	-	-	-	0,5	0,5	1	1	1	-
Kalcija stearāts	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
Stearīnskābe	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Talks	-	-	-	-	-	2	1	2	1	2	3	1
Birstamība, g · s ⁻¹ , vid.	0,96	6,81	6,71	6,91	5,51	6,22	6,38	7,02	7,31	7,40	7,23	6,35
SD (n=5)	0,04	0,10	0,24	0,11	0,03	0,07	0,19	0,17	0,18	0,10	0,24	0,23

SBE₁ maisījuma ar klijām (1 : 5) un slīdvielām (10. sastāva) pagatavošanas tehnoloģiskais process:

1. SBE₁ uzsildīšana līdz 40 °C temperatūrai.
2. SBE₁ un kliju samaisīšana attiecībā 1 : 5.
3. Maisījuma sasildīšana līdz (115 – 120) °C temperatūrai un žāvēšana līdz masas mitruma saturam (10 – 12) %.
4. Galaprodukta atdzesēšana līdz istabas temperatūrai.

5. Sijāšana caur sietu ar atveru lielumu 1 mm.
6. Samaisīšana ar 1 % magnija stearāta un 2 % talka (iepriekš izsijāti caur sietu ar atveru lielumu 0,5 mm).
7. Pildīšana cietajās želatīna kapsulās Nr. 00 pa 500 mg un pakošana tumša stikla burkāš pa 50 kapsulām.

Karotīnu saturs SBE_1 maisījuma ar klijām (1 : 5) un slīdvielām (10. sastāvā) uzreiz pēc pagatavošanas: $30,74 \pm 0,45$ mg %. Uzglabājot 6 mēnešus (25 ± 2) °C temperatūrā un (40 ± 2) °C temperatūrā, konstatēts, ka karotinoīdus un hlorofilus preparātā noteikt nevar. Iespējams, notiek karotinoīdu un hlorofilu oksidēšanās, vai arī citas ķīmiska rakstura pārmaiņas.

3.2.2. SBE saturošu mīksto želatīna kapsulu tehnoloģijas izstrāde

SBE mīksto želatīna kapsulu (MŽK) tehnoloģijas izstrādei eksperimentāli precizēti:

- 1) izejvielas – SBE optimālais mitruma saturs: SBE_1 un SBE_2 izmantošanas iespēja;
- 2) palīgvielu – augu eļļu un emulgatoru nomenklatūra un daudzums.

3.2.2.1. Iemērķšanas metode MŽK pagatavošanai

Želatīna masas pagatavošanai pārbaudīti literatūrā norādītie sastāvi (skat. 15. tab.).

15. tabula. Želatīna masas sastāvi mīksto kapsulu pagatavošanai

Nr. p.k.	Želatīna masas sastāvdaļas, %						Litera-tūras avots	Pagatavotas želatīna masas raksturojums
	Žela-tīns	Glice-rīns	Attīrīts ūdens	Nātrija meta-bisulfīts	Salicil-skābe	Nipa-gīns		
1.	18,52	37,04	44,44	-	-	-	[251]	Ļoti šķidra masa, nav piemērota MŽK pagatavošanai
2.	25	8	66,83	0,05	0,12	-	[146]	Šķidra masa, nav piemērota MŽK pagatavošanai
3.	37,36	27,17	35,30	0,05	0,12	-	[146]	Bieza masa, nav piemērota MŽK pagatavošanai
4.	41,1	30,1	28,8	-	-	-	[252]	Bieza masa, nav piemērota MŽK pagatavošanai
5.	41,67	22,92	35,24	0,05	0,12	-	[146]	Ļoti bieža masa, nav piemērota MŽK pagatavošanai
6.	31,14	22,64	46,08	-	-	0,14	-	Masa izmantota MŽK pagatavošanai

Sastāvi 1. un 2., kuri ir paredzēti MŽK iegūšanai ar iemērkšanas metodi, izrādījās nepiemēroti kapsulu iegūšanai, jo kapsulas veidojās ar ļoti plānām sienām, kuras bija grūti aizkausēt, un tās nebija mehāniski izturīgas. Sastāvus 3., 4. un 5., kuri ir paredzēti MŽK iegūšanai ar rotējošo presformu metodi, nevarēja izmantot kapsulu iegūšanai ar iemērkšanas metodi, jo veidojās ļoti bieza masa. Optimāls sastāvs MŽK iegūšanai ar iemērkšanas metodi pagatavots, par pamatu izmantojot 3. sastāvu un atšķaidot to ar 20 % ūdens (6. sastāvs).

Želatīna masas pagatavošana: vārglāzē nosver glicerīnu, pievieno attīrītu ūdeni, samaisa un uzsilda līdz 70 °C temperatūrai. Glicerīna-ūdens šķīdumā izšķīdina konservantus. Šķīdumam pievieno želatīnu, masu silda ūdens vannā (80 – 85) °C temperatūrā un lēni maisa, lai masā neiekļūtu gaiss, kamēr želatīns pilnīgi izšķīst. Pagatavoto masu ievieto termostatā 45 °C temperatūrā un termostatē 24 stundas.

MŽK gatavošanai ar iemērkšanas metodi izmanto metāla formas, kas sastāv no stienīša un ovāla uzbiezinājuma – galviņas, kuras lielums atbilst kapsulas iekšējam izmēram (skat. 25. att.). Formu galviņas un ~1 cm stienīša apslauka ar olīveļļā iemērkту lignīna salveti. Formas iestiprina turētājā un atdzesē ledusskapī (2 – 8) °C temperatūrā 5 min.



25. attēls. Metāla formas MŽK pagatavošanai ar iemērkšanas metodi

Atdzesētās formas vienmērīgi iegremdē želatīna masā ar temperatūru 45 °C un pēc 1 – 2 sekundēm izņem, ļaujot liekai masai nopilēt. Tad formas lēni kustina pagriežot ar galviņu uz leju un uz augšu, lai masa uz formas sastingtu vienmērīgā slānī. Formas iestiprina turētājā un atstāj ledusskapī (2 – 8) °C temperatūrā uz 5 min. Sastingušā želatīna apvalka kakliņu nogriež 0,5 cm attālumā no galviņas un noņem apvalku no formas.

Tukšās kapsulas ar vaļējiem galiem uz augšu ievieto statīvā. Ar šļirci iepilda kapsulās pildījumu. Kapsulu vaļējo galu aizkausē ar elektrisko lodāmuru (55 – 56) °C temperatūrā.

Kapsulas mazgā izopropilspirtā 20 minūtes un žāvē 24 – 48 stundas istabas temperatūrā.

3.2.2.2. SBE₁ kompozīciju pagatavošana pildīšanai MŽK

Pārbaudīta iespēja pildīt mīkstajās želatīna kapsulās SBE₁ bez palīgvielām. Konstatēts, ka kapsulas deformējas jau nākamajā dienā pēc pagatavošanas, jo SBE₁ liels mitruma saturs negatīvi iedarbojas uz kapsulas apvalku.

Lai samazinātu SBE₁ sastāvā esošā mitruma ietekmi uz kapsulu kvalitāti, pārbaudīta iespēja iegūt SBE₁ un augu eļļas viendabīgu maisījumu pildīšanai MŽK, jo šādās kapsulās bieži tiek pildīti dažādi eļļas šķīdumi un maisījumi.

SBE₁ maisījuma pagatavošanai izmantota saulespuķu un zemesriekstu eļļa. Šīs eļļas bieži izmanto par palīgvielām MŽK pildāmo šķīdumu un maisījumu pagatavošanai, tās iekļautas Eiropas Farmakopejā. Zemesriekstu eļļa satur salīdzinoši maz nepiesātinātu taukskābju triglicerīdu, līdz ar to tā mazāk pakļauta oksidēšanās procesiem.

Tā kā SBE₁ nejauca ar augu eļļām, viendabīga maisījuma pagatavošanai izmantotas virsmas aktīvās vielas (emulgatori). Samazinot virsmas spraigumu dispersās sistēmas fāzu robežā, tie veicina hidrofilo un lipofilo komponentu samaisīšanos.

Pagatavoti SBE₁ maisījumi ar augu eļļu attiecībā 1 : 1 un emulgatoriem 3 %, 5 % un 7 % daudzumā, un novērtēta to kvalitāte pēc masas viendabīguma un konsistences (skat. 16. tab.).

16. tabula. SBE₁ un augu eļļas (1 : 1) sastāvu ar emulgatoriem kvalitāte

Emulgators		Rezultāts*	Emulgators		Rezultāts*	Emulgators		Rezultāts*
nosaukums	%		nosaukums	%		nosaukums	%	
Tvins-20	3	±	Sorbital T40P	3	±	Rylo MG 20 Pharma	3	–
	5	+		5	+		5	±
							7	b/k
Tvins-40	3	–	Multec Soral MS	3	±	Rylo MD 50 Pharma	3	–
	5	–		5	+		5	±
	7	±					7	b/k
Tvins-60V	3	±	Multec Soral MO	3	±	Rylo AC 19 Pharma	3	–
	5	+		5	+		5	–
							7	b/k
Tvins-65	3	–	Emulgators T-2	3	–	Monoglicerīdi destilētie	3	–
	5	±		5	–		5	±
	7	±		7	b/k		7	b/k
Tvins-80	3	±	Pentols	3	–	*Rezultāts: + viendabīga masa; ± masa noslāņojas; – masa nesajaucas; b/k –biezas konsistences masa		
	5	+		5	±			
				7	±			

SBE₁ un augu eļļas (1 : 1) sastāvu ar emulgatoriem pagatavošanas tehnoloģija: emulgatoru izkausē ūdens vannā un samaisa ar augu eļļu (45 – 50) °C temperatūrā. SBE₁ uzsilda līdz (45 – 50) °C temperatūrai ūdens vannā un pievieno eļļas un emulgatora šķīdumam, maisa līdz iegūst viendabīgu maisījumu.

Konstatēts:

- SBE₁ maisījums ar zemesriekstu eļļu bez emulgatora neveido viendabīgu maisījumu.
- Emulgatora T-2 un Rylo AC 19 Pharma izmantošana neveicina SBE₁ un zemesriekstu eļļas viendabīga maisījuma iegūšanu.
- SBE₁ un zemesriekstu eļļas maisījuma ar emulgatoriem: pentols, tvins-40, tvins-65, Rylo MG 20 Pharma, Rylo MD 50 Pharma, monoglicerīdi destilētie – kvalitāte nav optimāla.
- Viendabīgu SBE₁ maisījumu ar zemesriekstu eļļu veido emulgatori: tvins-20, tvins-60V, tvins-80, Multec Soral MO, Multec Soral MS, Sorbital T40P.

SBE₁ un zemesriekstu eļļas (1 : 1) sastāvi ar 5 % emulgatoru: tvins-20, tvins-60V, tvins-80, Sorbital T40P, Multec Soral MS, Multec Soral MO, kuri bija viendabīgi un šķidras konsistences, tika iepildīti ar iemērķšanas metodi pagatavotajās MŽK. Kapsulas glabātas temperatūrā (25 ± 2) °C un (30 ± 2) °C. Konstatēts, ka, glabājot šajos apstākļos, kapsulas sāk deformēties pēc 1 nedēļas.

3.2.2.3. Žāvēta SBE₁ kompozīciju pagatavošana pildīšanai MŽK

Pārbaudīta iespēja par izejvielu izmantot žāvētu SBE₁. SBE₁ paraugi žāvēti Petri platēs plānā slānī 60 °C temperatūrā 72 stundas. Paraugi atdzesēti, svērti, tad atkal sildīti, un silts izžāvēts SBE₁ noņemts no Petri platēm. Laboratorijas apstākļos ir izdevies izžāvēt SBE₁ līdz mitruma un gaistošo vielu zudumam 35 – 41,6 % (skat. 17. tab.). Žāvēts SBE₁ izmantots kapsulu pildīšanai paredzēto sastāvu pagatavošanai.

17. tabula. SBE₁ paraugu masas zudums žāvējot 60 °C temperatūrā

Nr. p.k.	Parauga masa pirms žāvēšanas	Paraugu skaits	Parauga masa pēc žāvēšanas	Masas zudums, %
1.	20,0	1	13,0	35,0
2.	20,0	2	12,7	36,5
3.	20,0	3	12,1	39,5
4.	20,0	2	12,0	40,0
5.	20,0	6	11,9	40,5
6.	20,0	3	11,8	41,0
7.	20,0	2	11,7	41,5
8.	25,0	1	15,1	39,6
9.	25,0	5	15,0	40,0
10.	25,0	5	14,9	40,4
11.	25,0	7	14,8	40,8
12.	25,0	4	14,7	41,2
13.	25,0	2	14,6	41,6

Pārbaudīta iespēja pagatavot žāvētā SBE₁ viendabīgu maisījumu ar augu eļļu bez emulgatora. Konstatēts, ka žāvētā SBE₁ maisījums ar zemesriekstu vai saulespuķu eļļu bez emulgatora neveido viendabīgu maisījumu.

Pagatavoti žāvēta SBE₁ ar zemesriekstu vai saulespuķu eļļu sastāvi ar emulgatoru attiecībā 30 : 65 : 5. Pagatavošanas tehnoloģija aprakstīta p. 3.2.2.2. Sastāvu kvalitāte vērtēta pēc masas viendabīguma un konsistences (skat. 18. tab.).

18. tabula. Žāvēta SBE₁ un augu eļļas sastāvu ar emulgatoriem (30 : 65 : 5) kvalitāte

Emulgators	Rezultāts*	Emulgators	Rezultāts*	Emulgators	Rezultāts*
Tvins-20	±	Sorbital T40P	±	Rylo MG 20 Pharma	+
Tvins-40	–	Multec Soral MS	±	Rylo MD 50 Pharma	±
Tvins-60V	–	Multec Soral MO	±	Rylo AC 19 Pharma	±
Tvins-65	–	Emulgators T-2	+	Monoglicerīdi destilētie	+
*Rezultāts: + viendabīga masa; ± masa noslāņojas; – masa nesajaucas					

Konstatēts:

- Emulgatoru: Tvins-20, Rylo MD 50 Pharma un Rylo AC 19 Pharma izmantošana neveicina žāvēta SBE₁ un zemesriekstu vai saulespuķu eļļas viendabīgas emulsijas iegūšanu.
- Viendabīgu žāvēta SBE₁ emulsiju ar zemesriekstu vai saulespuķu eļļu veido: emulgators T-2, Rylo MG 20 Pharma un monoglicerīdi destilētie.

3.2.2.4. SBE₂ saturošu MŽK laboratorijas sērijas pagatavošana ar iemērkšanas metodi

Tālāk darbā tika izmantots rūpnieciski iegūts SBE ar mitruma un gaistošo vielu saturu NVP 10 % – SBE₂.

Pildīšanai MŽK SBE₂ un zemesriekstu eļļas maisījuma pagatavošanai izmantots emulgators Rylo MG 20 Pharma (glicerīna monooleāts, GMO), jo tā kvalitāte atbilst Eiropas Farmakopejas prasībām.

Pagatavotais sastāvs: SBE₂ ar zemesriekstu eļļu un GMO (30 : 65 : 5) tika iepildīts pa 1 g (satur 300 mg SBE₂) ar iemērkšanas metodi iegūtajās MŽK.

SBE₂ saturošu MŽK laboratorijas sērijas pagatavošanas tehnoloģiskais process un starpstadiju kontrole (skat. 26. att.):

1. SBE₂ maisījuma ar emulgatoru GMO un zemesriekstu eļļu pagatavošana.
 - 1.1. Izejmateriālu – SBE₂, zemesriekstu eļļas, GMO sagatavošana.
 - 1.2. Izejmateriālu svēršana.

Stadijas kontrole: masas kontrole.
 - 1.3. GMO kausēšana ūdens vannā un samaisīšana ar zemesriekstu eļļu (45 – 50) °C temperatūrā.
 - 1.4. SBE₂ uzsildīšana līdz (45 – 50) °C temperatūrai ūdens vannā un pievienošana GMO šķīdumam zemesriekstu eļļā, samaisīšana līdz viendabīgam maisījumam.

Stadijas kontrole: temperatūras kontrole, masas viendabīguma kontrole (vizuāli).

1.5. Maisījuma atdzesēšana līdz (20 – 25) °C temperatūrai.

Stadijas kontrole: temperatūras kontrole.

2. Želatīna masas pagatavošana.

2.1. Izejmateriālu – želatīna, glicerīna, nipagīna, attīrīta ūdens sagatavošana.

2.2. Izejmateriālu svēršana.

Stadijas kontrole: masas kontrole.

2.3. Glicerīna un attīrīta ūdens samaisīšana, sildīšana līdz 70 °C temperatūrai; nipagīna pievienošana un šķīdināšana; želatīna pievienošana un sildīšana ūdens vannā (80 – 85) °C temperatūrā, lēni maisot līdz viendabīgai masai.

Stadijas kontrole: temperatūras kontrole, masas viendabīguma kontrole (vizuāli).

2.4. Želatīna masas termostātēšana 45 °C temperatūrā 24 stundas.

Stadijas kontrole: temperatūras kontrole.

3. SBE₂ saturošu MŽK pagatavošana.

3.1. Kapsulu formu sagatavošana: ieziešana ar olīveļļu un atdzesēšana ledusskapī (2 – 8) °C temperatūrā 5 min.

Stadijas kontrole: temperatūras kontrole un laika kontrole.

3.2. MŽK apvalku pagatavošana: formu iegremdēšana želatīna masā uz 1 – 2 sekundēm un atdzesēšana ledusskapī (2 – 8) °C temperatūrā 5 minūtes, želatīna apvalciņu noņemšana no formām un iestiprināšana statīvā.

Stadijas kontrole: temperatūras un laika kontrole.

3.3. Želatīna kapsulu piepildīšana ar SBE₂ saturošu sastāvu pa 1 g (~1,1 ml) ar šļirces palīdzību. Stadijas kontrole: pildījuma masas kontrole.

3.4. Kapsulu aizkausēšana ar elektrisko lodāmuru (55 – 56) °C temperatūrā.

Stadijas kontrole: aizkausējuma kvalitātes kontrole (vizuāli).

3.5. Kapsulu mazgāšana izopropilspirtā 20 minūtes.

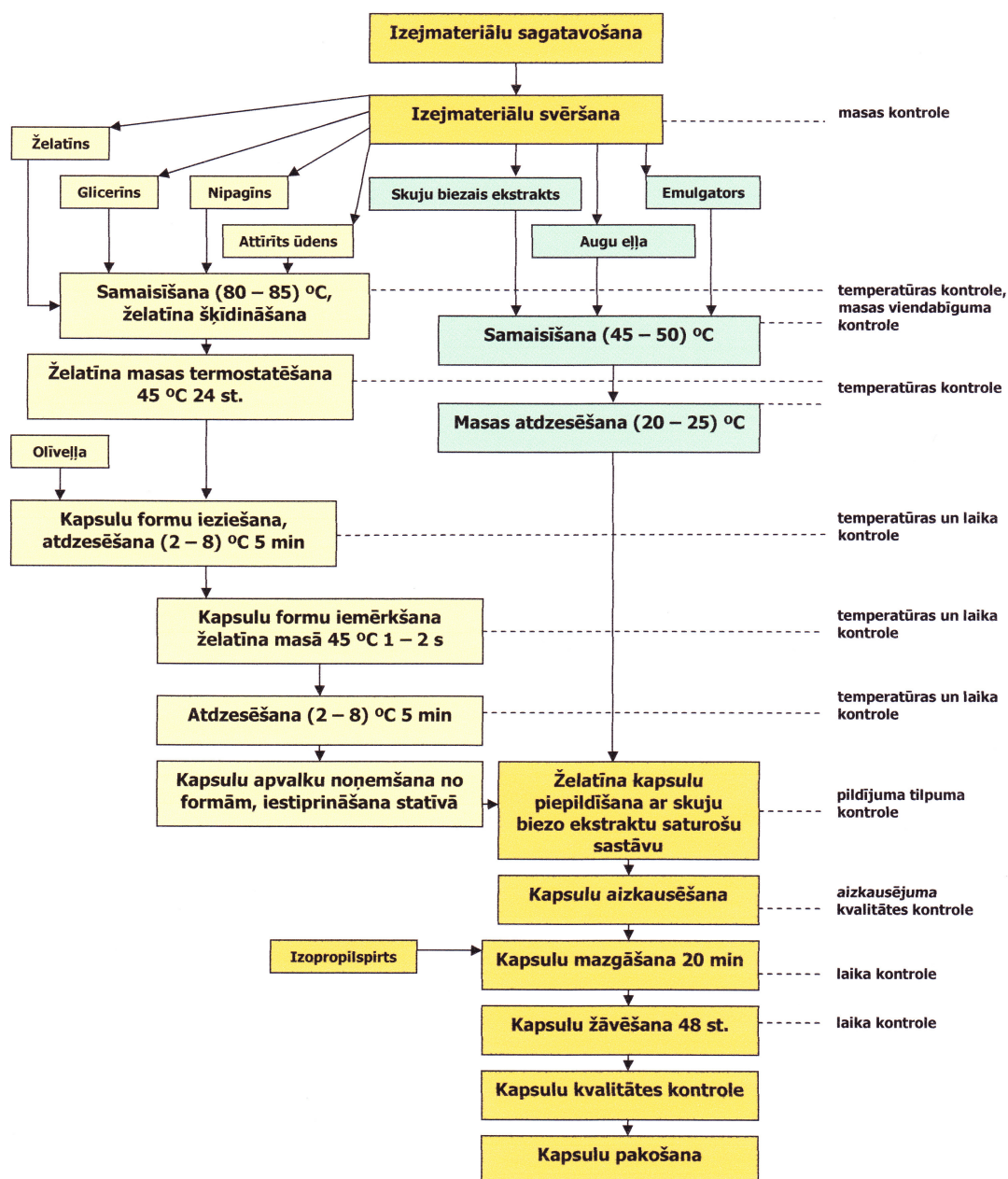
Stadijas kontrole: laika kontrole.

3.6. Kapsulu žāvēšana 48 stundas istabas temperatūrā.

Stadijas kontrole: laika kontrole (skat. 19. tab.).

3.7. SBE₂ saturošu MŽK kvalitātes kontrole.

3.8. SBE₂ saturošu MŽK pakošana.



26. attēls. SBE₂ saturošu MŽK laboratorijas sērijas pagatavošanas tehnoloģiskā procesa shēma

Ar iemērkšanas metodi pagatavoto MŽK ar SBE₂, zemesriekstu eļļu un GMO (30 : 65 : 5) sastāvu pa 1 g kapsulā kvalitātes rādītāji redzami 19. tabulā. Iegūtās kapsulas pēc visiem rādītājiem atbilda specifikācijas prasībām, vienīgi kapsulu satura masas novirzes nedaudz pārsniedza pieļaujamās robežas, kas izskaidrojams ar to, ka kapsulas tika gatavotas un pildītas ar rokām. Pagatavoto kapsulu ārējais izskats redzams 27. attēlā.

19. tabula. Ar iemērkšanas metodi pagatavoto MŽK ar SBE₂ 300 mg kvalitātes rādītāji

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	Rezultāti	n
Ārējais izskats	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar redzamu aizkausējuma vietu, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Atbilst	20
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra $\lambda_{\max}$, nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Atbilst	3
Kapsulas satura vidējā masa, g	1,0000	0,9728	20
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, g %	$0,9250 - 1,0750$ $\pm 0,0750$ $\pm 7,5$	$0,9120 - 1,0455$ $-0,0608 \div +0,0727$ $-6,25 \div +7,47$	20
Sairšanas laiks, min	Ne vairāk par 30	8 – 10	6
Karotīnu saturs (vid. $\pm$ SD) preparātā, mg % kapsulā, μ g	Ne mazāk par 30 Ne mazāk par 80	$38,94 \pm 0,58$ $104,1 \pm 1,6$	3
Sērijas lielums	Laboratorijas sērija, 0,5 kg pildījuma masas		
Primārais iepakojums	ABPE konteineri ar ZBPE vākiem		



27. attēls. Ar iemērkšanas metodi iegūtās MŽK ar SBE₂ saturošu sastāvu

3.2.3. Cieto kapsulu pildīšana ar SBE₂ saturošu sastāvu

Rūpnieciskajā ražošanā pastāv iespēja pildīt cietajās kapsulās šķidras un mīkstas konsistences pildījumus. Tāpēc laboratorijas apstākļos ir pārbaudīta iespēja pildīt cietajās želatīna kapsulās SBE₂ saturošu sastāvu.

Sastāvs pildīšanai kapsulās pagatavots atbilstoši p. 3.2.2.4.(1) un ar šļirces palīdzību iepildīts cietajās želatīna kapsulās pa 0,5 g.

Pagatavoto kapsulu kvalitātes rādītāji redzami 20. tabulā. Iegūtās kapsulas atbilda specifikācijas prasībām, izņemot, kapsulu satura masas novirzes pārsniedza pieļaujamās robežas, kas izskaidrojams ar to, ka kapsulas tika pildītas ar rokām. Pagatavoto kapsulu ārējais izskats redzams 28. attēlā.

20. tabula. Cieto kapsulu, pildītu ar SBE₂ 150 mg kvalitātes rādītāji

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	Rezultāti	n
Ārējais izskats	Cietās želatīna kapsulas, kas satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Atbilst	20
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra $\lambda_{\max}$, nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Atbilst	3
Kapsulas satura vidējā masa, g	0,5000	0,5479	20
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, g %	$0,4625 - 0,5375$ $\pm 0,0375$ $\pm 7,5$	$0,4789 - 0,6303$ $-0,0690 \div +0,0824$ $-7,44 \div +7,03$	20
Saišanas laiks, min	Ne vairāk par 30	4 – 6	6
Karotīnu saturs (vid. $\pm$ SD) preparātā, mg %	Ne mazāk par 30	33,91 $\pm$ 1,18	3
Sērijas lielums	Laboratorijas sērija, 0,5 kg pildījuma masas		
Primārais iepakojums	ABPE konteineri ar ZBPE vākiem		



28. attēls. Cietās želatīna kapsulas pildītas ar SBE₂ saturošu sastāvu

3.2.4. Ražošanā izmantojamo kapsulu iegūšanas metožu pielietošanas iespējas SBE₂ saturoša sastāva iekapsulēšanai

3.2.4.1. Pilināšanas metodes izmantošana MŽK pagatavošanai ar SBE₂ saturošu sastāvu

MŽK ar SBE₂ saturošu sastāvu pagatavošana ar pilināšanas metodi veikta A/S „RealCaps” Maskavā, Krievijā.

Pagatavots SBE₂ sastāvs iekapsulēšanai:

SBE ₂	30 %	1,000 kg
Emulgators GMO	5 %	0,167 kg
Sojas eļļa	65 %	2,167 kg
Kopējā masa:	100%	3,334 kg

Pagatavošanas tehnoloģija: atbilstoši p. 3.2.2.4.(1). Pagatavots sastāvs atdzesēts līdz 23 °C temperatūrai un padots uz iekapsulēšanu.

Mīksto želatīna kapsulu pagatavošanai izmantota iekārta „Kapsulator” (ražota Baltkrievijā). Kapsulu pagatavošanai izmantota uzņēmumā pagatavotā želatīna masa.

Kapsulu pagatavošanas tehnoloģija.

Kapsulu pildījuma masa no rezervuāra zem spiediena tiek padota dozējošā iekārtā, no kuras tā vienlaikus ar izkausēto želatīna masu, kura ir uzsildīta līdz 60 °C temperatūrai, no rezervuāra tiek izstumta kapsulu veidošanas mezglā. Kapsulas tiek izveidotas ar pulsatora palīdzību un nonāk cirkulējošā dzesētāja sistēmā (līdz +10 °C temperatūrai atdzesētajā sojas eļļā), kurā kapsulu želatīna apvalki sastingst. Tālāk gatavās kapsulas nokļūst tvertnē ar līdz +10 °C temperatūrai atdzesētu sojas eļļu. Atdzesētās sojas eļļas padeve uz pulsatoru un kapsulu dzesēšanas sistēmā notiek ar sūkņu palīdzību. Kapsulas iztur atdzesēšanas kamerā, nospiež no eļļas, žāvē un mazgā ar izopropilspirtu.

SBE₂ MŽK iegūšanas procesā no sākuma izveidojās sfēriskas formas kapsulas: pildījuma pilienu aptvēra želatīna masas piliens, bet, nonākot līdz dzesēšanas caurules apakšdaļai, vairākumā gadījumu pildījums pārrāva želatīna apvalku un izplūda ārā. Transporta eļļas samaisīšanās ar kapsulu pildījumu apgrūtināja tālāko kapsulu iegūšanu. Nomainot transporta eļļu, izdevās iegūt nelielu daudzumu kapsulu, bet, tiklīdz notika kapsulu plīšana, atkal vairs neizdevās iegūt veselas kapsulas, un atkal bija jāmaina transporta eļļa.

Pārbaudīta iespēja iegūt kapsulas ar sastāvu, kas uz pusi atšķaidīts ar eļļu (saturēja 15 % SBE₂, 2,5 % GMO un 82,5 % sojas eļļas), kā arī pārbaudīta iespēja iegūt kapsulas ar pildījuma masu 0,6 g un ar pildījuma masu 0,3 g.

Visos mēģinājumos kapsulu iegūšanas procesā veidojās daudz brāķēto kapsulu. Iegūtās kapsulas atšķīrās savā starpā pēc formas, izmēra un masas (skat 29. att.).



29. attēls. Ar pilināšanas metodi iegūtās MŽK ar SBE₂ saturošu sastāvu

3.2.4.2. Presēšanas metodes izmantošana MŽK pagatavošanai ar SBE₂ saturošu sastāvu

MŽK ar SBE₂ saturošu sastāvu pagatavošana ar presēšanas metodi veikta uzņēmumā „Minskinterkaps”, Baltkrievijā. Pagatavotas trīs preparāta pilotsērijas un divas ražošanas sērijas (skat. 21. tab.).

21. tabula. Ar presēšanas metodi pagatavotās SBE₂ MŽK sērijas

Sērijas veids	Pildījuma masas daudzums, kg	Kapsulu pildījuma sastāvs, kg			Primārā iepakojuma veids
		SBE ₂	GMO	Saulespuķu eļļa	
1. Pilotsērija	5	2,5	0,25	2,25	Al/PVH blisteri
2. Pilotsērija	10	5,0	0,5	4,5	ABPE konteineri ar ZBPE vākiem
3. Pilotsērija	10	5,0	0,5	4,5	Al/PVH blisteri
I Ražošanas sērija	90	45,0	4,5	40,5	Al/PVH blisteri
II Ražošanas sērija	90	45,0	4,5	40,5	ABPE konteineri ar ZBPE vākiem

MŽK pagatavošanai ar presēšanas metodi pagatavotais pildījums saturēja 50 % SBE₂, 45 % saulespuķu eļļas un 5 % glicerīna monooleāta (GMO). SBE₂ saturs pildījumā tika palielināts ar mērķi samazināt kapsulas pildījuma masu un attiecīgi kapsulas izmērus. Katra kapsula saturēja 600 mg pildījuma (300 mg SBE₂).

Kapsulu pagatavošanas tehnoloģija.

1. Izejvielu svēršana (atbilstoši 21. tabulā norādītiem daudzumiem).

2. Kapsulu pildījuma masas pagatavošana. Saulespuķu eļļa uzsildīta līdz 45 °C temperatūrai ūdens vannā. Emulgators GMO izkausēts ūdens vannā un samaisīts ar eļļu 45 °C temperatūrā. SBE₂ uzsildīts līdz 45 °C temperatūrai ūdens vannā un pievienots tvertnē ar emulgatora šķīdumu eļļā, maisīts līdz iegūts viendabīgs maisījums.

- 1. pilotsērijas pagatavošanai SBE₂ ar emulgatora šķīdumu eļļā maisīts mikserī ar ātrumu no 300 – 430 – 500 apgr.·min⁻¹ 10 min;
- 2. un 3. pilotsērijas pagatavošanai SBE₂ ar emulgatora šķīdumu eļļā maisīts ar lāpstiņu, lēnām 15 min;
- ražošanas sēriju pagatavošanai maisīšana notika ar mikseri-rotosolveri 105RS88 ar maziem apgriezieniem (25 – 30 apgr.·min⁻¹) 30 min.

Masa filtrēta caur filtrējošo maisu pārņemšanas tvertnē, nosvērta un nostādināta (40 – 42) °C temperatūrā 2 stundas. Tālāk masa padota uz iekapsulēšanu; veikta temperatūras kontrole: (38 – 42) °C.

3. Želatīna masas pagatavošana. Kapsulu iegūšanai izmantota uzņēmumā pagatavotā želatīna masa (liellopu kaulu/ādas želatīns (Slovākija); gela stingrums: 150 *Bloom*).

4. Kapsulu presēšana. Kapsulu presēšana veikta uz rotējošo presformu automāta Supra-1 (GIS, ASV). Želatīna masa padota uz iekapsulēšanu 60 °C temperatūrā. Pildījums padots uz iekapsulēšanu 39,5 °C temperatūrā. Želatīna lenta veidojās pie temperatūras 14 °C, lentas biezums 0,7 – 0,75 mm. Želatīna lenta apstrādāta ar *Migliolu* (eļļas sakausējumu ar lecitīnu). Dozējošā ķīļa temperatūra (38 – 40) °C. Kapsulu masa regulējama robežās ± 3 % no 600 mg.

5. Kapsulu žāvēšana. Primārā kapsulu žāvēšana veikta rotējošajos žāvēšanas cilindriskos grozos 5 segmentos pa 24 min katrā dažādos temperatūras režīmos no 33 °C līdz 20 °C. Tālāk kapsulas žāvētas uz paliktņiem žāvēšanas kamerā. Pēc žāvēšanas veikta kapsulu attīrīšana no eļļas ar etilspirtu.

6. Neiepakotu kapsulu kvalitātes kontrole (ārējais izskats, dozēšanas viendabīgums, kapsulu sairšanas laiks, karotīnu saturs).

7. Kapsulu pakošana. Kapsulu iepakojšanai izmantots divu veidu primārais iepakojums: alumīnija folijas un caurspīdīgas bezkrāsainas polivinilhlorīda plēves (Al/PVH) blisteri, un ABPE konteineri ar ZBPE uzspiežamiem vākiem. Kapsulu iepakojšana blisteros veikta automātiskajā iekārtā TR-130 (IMA, Itālija) pa 10 kapsulām blisterī. Sekundārais iepakojums: divi blisteri (20 kapsulas) kopā ar lietošanas instrukciju ievietoti kartona kastītē.

8. Galaprodukta kvalitātes kontrole (atbilstoši specifikācijas prasībām).

Visās sērijās iegūtās kapsulas pēc ārējā izskata atbilda specifikācijas prasībām (skat. 30. att.). Kapsulu kvalitātes rādītāji doti 22. tabulā. 1. pilotsērijas kapsulas pēc karotīnu satura neatbilda kvalitātes prasībām. 2. un 3. pilotsērijas un I un II ražošanas sērijas kapsulu kvalitāte bija apmierinoša.

22. tabula. Ar presēšanas metodi pagatavoto MŽK ar SBE₂ 300 mg kvalitātes rādītāji

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	n	Rezultāti				
			1. pilotsērija	2. pilotsērija	3. pilotsērija	I ražošanas sērija	II ražošanas sērija
Ārējais izskats	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar redzamu aizkausējuma vietu, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	20	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra $\lambda_{\max}$, nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	plecs 425; 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	3	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Kapsulas satura vidējā masa, g	0,6000	20	0,6087	0,5997	0,5809	0,5885	0,5823
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, g %	$0,5550 - 0,6450 \pm 0,0450 \pm 7,5$	20	$0,5842 - 0,6314 -0,0245 \div +0,0227 -4,03 \div +3,73$	$0,5811 - 0,6140 -0,0186 \div +0,0143 -3,09 \div +2,39$	$0,5707 - 0,5878 -0,0102 \div +0,0069 -1,75 \div +1,19$	$0,5780 - 0,5987 -0,0105 \div +0,0102 -1,78 \div +1,74$	$0,5727 - 0,5908 -0,0096 \div +0,0085 -1,65 \div +1,46$
Sairšanas laiks, min	Ne vairāk par 30	6	18 – 20	18 – 20	17 – 19	17 – 20	18 – 20
Karotīnu saturs (vid. $\pm$ SD) preparātā, mg % kapsulā, μ g	Ne mazāk par 30 Ne mazāk par 80	3	$22,03 \pm 0,86$ $58,9 \pm 2,3$	$41,89 \pm 1,13$ $112,1 \pm 3,0$	$36,36 \pm 0,43$ $97,3 \pm 1,2$	$36,78 \pm 0,52$ $98,4 \pm 1,4$	$36,45 \pm 0,93$ $97,5 \pm 2,5$



30. attēls. Ar presēšanas metodi iegūtās MŽK ar SBE₂ saturošu sastāvu

3.2.5. MŽK pildījuma SBE₂ saturoša sastāva dispersās sistēmas raksturojums

Ar presēšanas metodi pagatavotam MŽK pildījumam (SBE₂, saulespuķu eļļas un glicerīna monooleāta (50 : 45 : 5) maisījumam) veikta mikroskopiska analīze, lai noteiktu dispersās sistēmas tipu.

Apskatot gaismas mikroskopā $\times 400$ palielinājumā pildījuma paraugu, ir redzams dzeltens fons ar neregulāras formas bezkrāsainiem caurspīdīgiem ieslēgumiem un nepareizas formas brūnas krāsas ieslēgumiem. Ar eļļā šķīstošu krāsvielu Sudānu III paraugs iekrāsojas oranžā krāsā un zem mikroskopa ir redzami nepareizas formas bezkrāsaini un brūnas krāsas ieslēgumi uz oranža fona, ka arī atsevišķi krāsas kristāli. Ar ūdenī šķīstošu krāsvielu metilenzilo paraugā redzami zilās krāsas kristāli uz dzeltena fona.

Var secināt, ka pēc dispersoloģiskās klasifikācijas pagatavotais SBE₂ sastāvs ir ūdens/eļļā dispersā sistēma. Eļļas fāzi veido saulespuķu eļļa ar tajā izšķīdušām SBE₂ sastāvā esošām lipofīlām vielām, t.sk. karotinoīdiem. Ūdens daļu pārstāv SBE₂ sastāvā esošais mitrums un liofilas vielas. Sastāvā ir arī ūdenī un taukos nešķīstošas sveķveida u.c. vielas.

3.3. SBE₂ dozētas formas stabilitātes izpēte

3.3.1. SBE₂ MŽK laboratorijas sērijas stabilitāte

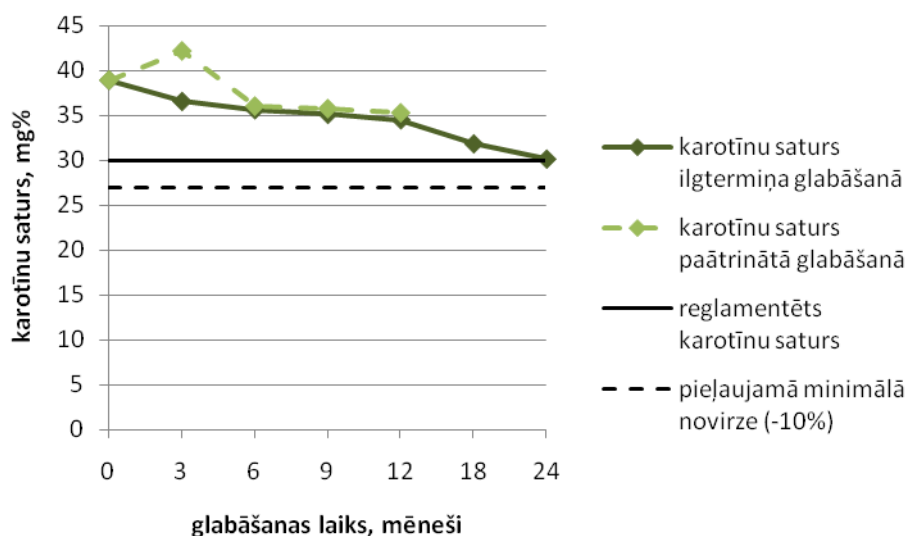
Ilgtermiņa un paātrinātā stabilitātes pētījuma laikā ar iemērķšanas metodi laboratorijas sērijas SBE₂ saturošās MŽK saglabāja kvalitāti visu pārbaudes periodu (skat. 4. pielikumu).

Kapsulu ārējais izskats un dozēšanas viendabīgums saglabājās reglamentēto normu robežās. Kapsulas bija ovālas formas ar redzamu aizkausējuma vietu, saturēja biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu. Atsevišķo kapsulu masa bija $\pm 7,5$ % robežās no kapsulu vidējās masas.

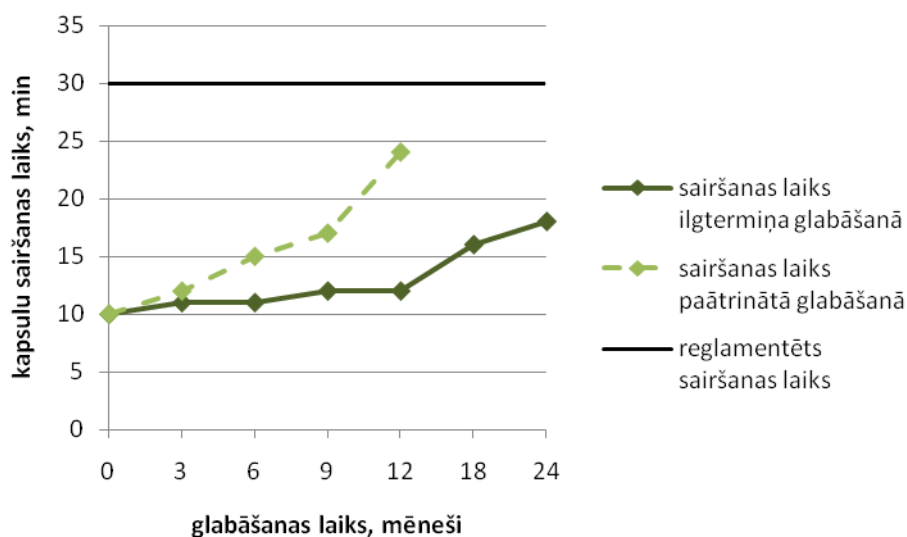
SBE₂ saturošo MŽK stabilitāte ilgtermiņa glabāšanā (25 ± 2) °C un paātrinātā glabāšanā (30 ± 2) °C, vērtējot pēc kapsulu sairšanas laika un karotīnu summas satura, ir parādīta 23. tabulā un 31., 32. attēlā. Karotīnu saturs kapsulās pēc pagatavošanas bija 38,94 mg % (norma: NMP 30 mg %), sairšanas laiks – no 8 līdz 10 min (norma: NVP 30 min). Ilgtermiņa glabāšanas perioda beigās pēc 24 mēnešiem karotīnu saturs kapsulās samazinājās līdz 30,12 mg %, sairšanas laiks palielinājās līdz 15 – 18 min; paātrinātās glabāšanas perioda beigās pēc 12 mēnešiem karotīnu saturs bija 35,34 mg %, sairšanas laiks 20 – 24 min, kas nepārsniedza pieļaujamās normas.

23. tabula. Laboratorijas sērijas SBE₂ MŽK stabilitāte

Glabāšanas laiks	Ilgtermiņa glabāšana (25 ± 2) °C		Paātrinātā glabāšana (30 ± 2) °C	
	Karotīnu saturs, mg % (vid. $\pm$ SD, n = 3)	Sairšanas laiks, min (n = 6)	Karotīnu saturs, mg % (vid. $\pm$ SD, n = 3)	Sairšanas laiks, min (n = 6)
Kvalitātes specifikācija	NMP 30	NVP 30	NMP 30	NVP 30
Pirms glabāšanas	38,94 $\pm$ 0,58	8 – 10	38,94 $\pm$ 0,58	8 – 10
3 mēneši	36,57 $\pm$ 0,42	8 – 11	42,14 $\pm$ 0,82	9 – 12
6 mēneši	35,64 $\pm$ 0,52	9 – 11	36,07 $\pm$ 0,74	12 – 15
9 mēneši	35,12 $\pm$ 0,87	9 – 12	35,80 $\pm$ 0,69	14 – 17
12 mēneši	34,52 $\pm$ 0,94	10 – 12	35,34 $\pm$ 0,85	20 – 24
18 mēneši	31,83 $\pm$ 1,73	13 – 16	-	-
24 mēneši	30,12 $\pm$ 0,80	15 – 18	-	-



31. attēls. Karotīnu saturs laboratorijas sērijas SBE₂ MŽK glabāšanas laikā

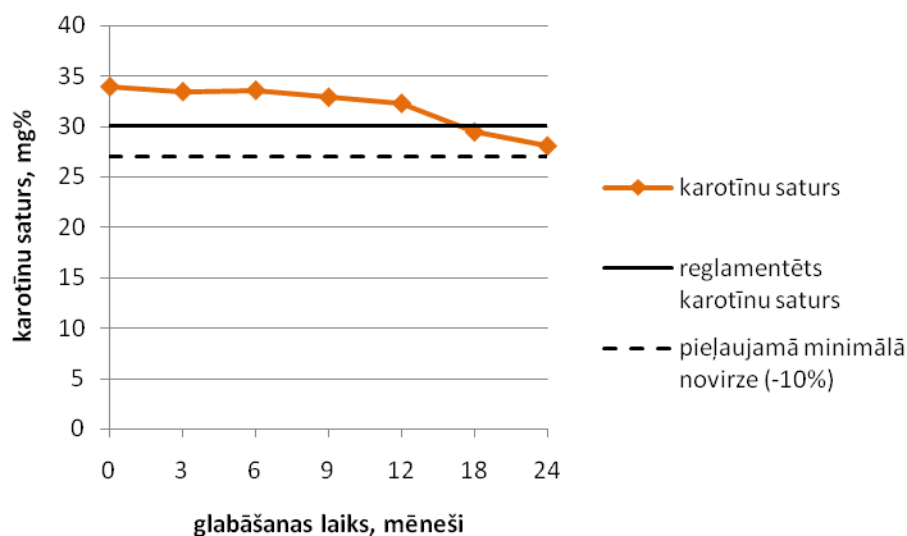


32. attēls. Laboratorijas sērijas SBE₂ MŽK sairšana glabāšanas laikā

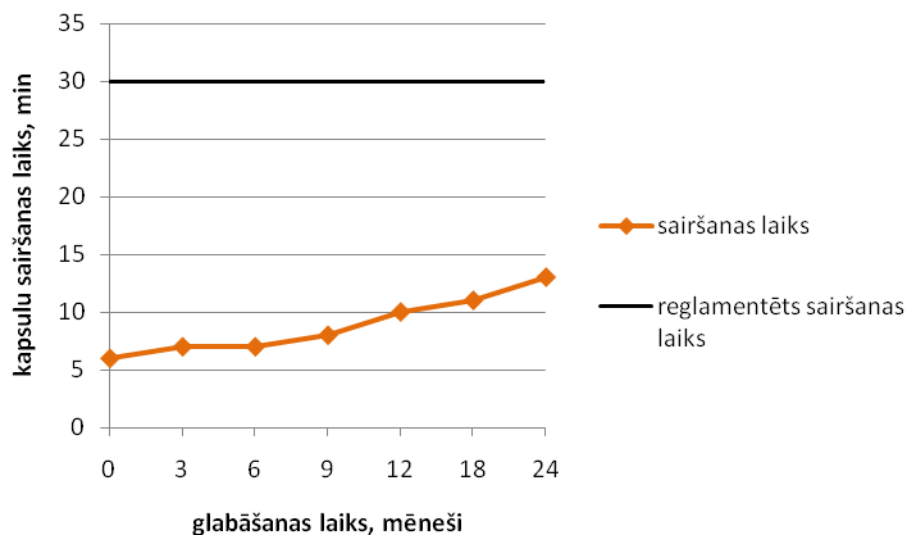
Ar SBE₂ saturošu sastāvu pildītās cietās želatīna kapsulas glabātas temperatūrā (25 ± 2) °C ilgtermiņā. Periodiski veicot kvalitātes kontroli konstatēts, ka kapsulu ārējais izskats saglabājās normas robežās, atsevišķo kapsulu masa bija $\pm 7,5$ % robežās no kapsulu vidējās masas. Karotīnu summas saturs un kapsulu sairšanas laiks nepārsniedza pieļaujamās normas (skat. 24. tab., 33., 34. att.).

24. tabula. Laboratorijas sērijas SBE₂ cieto želatīna kapsulu stabilitāte

Glabāšanas laiks	Ilgttermiņa glabāšana (25 ± 2) °C	
	Karotīnu saturs, mg % (vid. ± SD, n = 3)	Sairšanas laiks, min (n = 6)
Kvalitātes specifikācija	NMP 30	NVP 30
Pirms glabāšanas	33,91±1,18	4 – 6
3 mēneši	33,43±0,56	4 – 7
6 mēneši	33,56±0,75	5 – 7
9 mēneši	32,88±0,97	5 – 8
12 mēneši	32,27±1,68	6 – 10
18 mēneši	29,46±1,55	8 – 11
24 mēneši	28,10±1,25	9 – 13



33. attēls. Karotīnu saturs laboratorijas sērijas SBE₂ cietās želatīna kapsulās glabāšanas laikā



34. attēls. Laboratorijas sērijas SBE₂ cieto želatīna kapsulu sairšana glabāšanas laikā

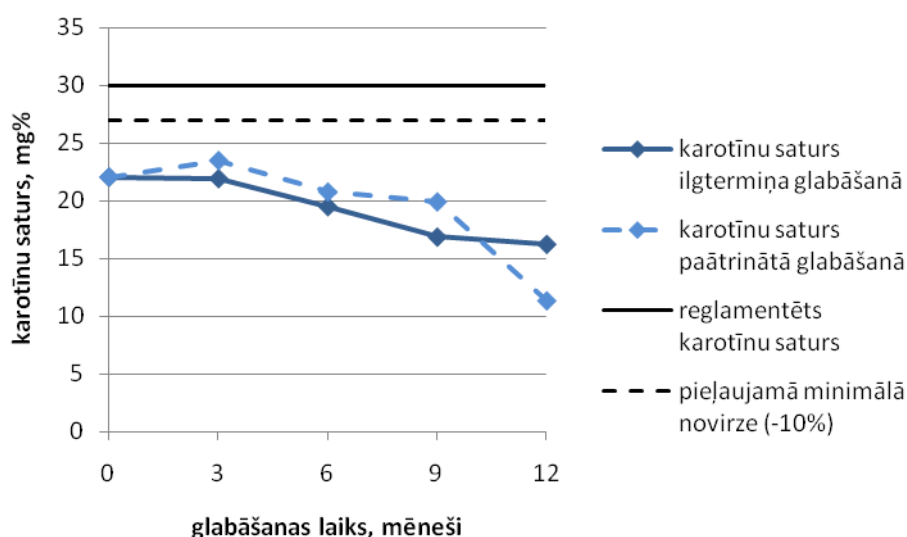
3.3.2. SBE₂ MŽK pilotsēriju stabilitāte

SBE₂ MŽK pilotsēriju stabilitātes pētījumu rezultāti atrodami 5., 6. un 7. pielikumā. Stabilitātes pētījumu laikā visu pagatavoto pilotsēriju kapsulu ārējais izskats un dozēšanas viendabīgums saglabājās reglamentēto normu robežās. Kapsulas bija ovālas formas ar šuvi, saturēja biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu. Atsevišķo kapsulu masa bija $\pm 7,5$ % robežās no kapsulu vidējās masas.

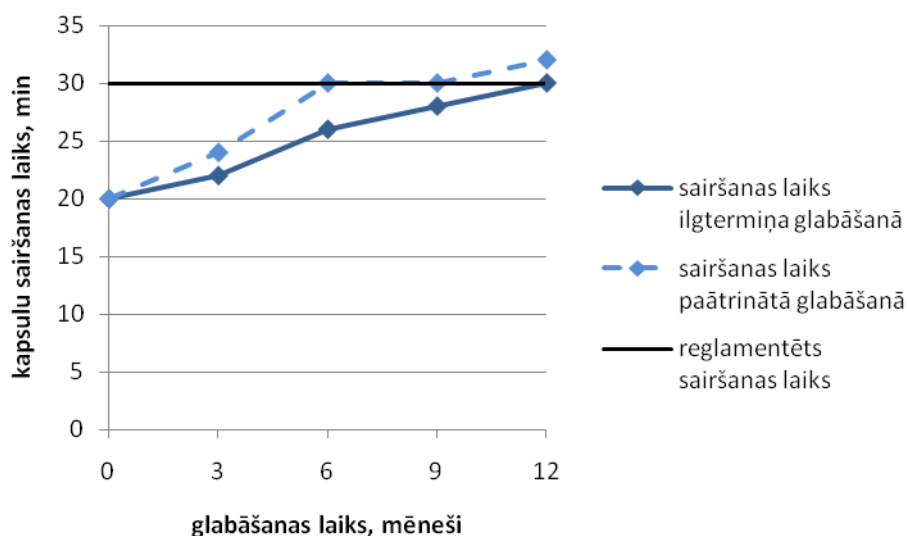
SBE₂ MŽK 1. pilotsērijas stabilitāte ilgtermiņa glabāšanā un paātrinātā glabāšanā, vērtējot pēc kapsulu sairšanas laika un karotīnu summas satura ir parādīta 25. tabulā un 35. attēlā. 1. pilotsērijas kvalitāte neatbilda prasībām jau uzreiz pēc pagatavošanas: karotīnu saturs kapsulās bija zemāks par normu – 22,03 mg %, sairšanas laiks bija normas robežās – no 18 līdz 20 min. Ilgtermiņa glabāšanas perioda beigās pēc 12 mēnešiem karotīnu saturs kapsulās samazinājās līdz 16,22 mg %, sairšanas laiks pieauga līdz 26 – 30 min; paātrinātās glabāšanas perioda beigās karotīnu saturs bija 11,33 mg %, sairšanas laiks 29 – 30 min.

25. tabula. 1. pilotsērijas SBE₂ MŽK stabilitāte

Glabāšanas laiks	Ilgtermiņa glabāšana (25 ± 2) °C		Paātrinātā glabāšana (30 ± 2) °C	
	Karotīnu saturs, mg % (vid. $\pm$ SD, n = 3)	Sairšanas laiks, min (n = 6)	Karotīnu saturs, mg % (vid. $\pm$ SD, n = 3)	Sairšanas laiks, min (n = 6)
Kvalitātes specifikācija	NMP 30	NVP 30	NMP 30	NVP 30
Pirms glabāšanas	22,03 $\pm$ 0,86	18 – 20	22,03 $\pm$ 0,86	18 – 20
3 mēneši	21,91 $\pm$ 0,29	19 – 22	23,45 $\pm$ 0,46	22 – 24
6 mēneši	19,48 $\pm$ 0,50	23 – 26	20,73 $\pm$ 0,24	26 – 30
9 mēneši	16,85 $\pm$ 0,34	26 – 28	19,88 $\pm$ 1,56	28 – 30
12 mēneši	16,22 $\pm$ 0,19	26 – 30	11,33 $\pm$ 0,23	29 – 32



35. attēls. Karotīnu saturs 1. pilotsērijas SBE₂ MŽK glabāšanas laikā



36. attēls. 1. pilotsērijas SBE₂ MŽK sairšana glabāšanas laikā

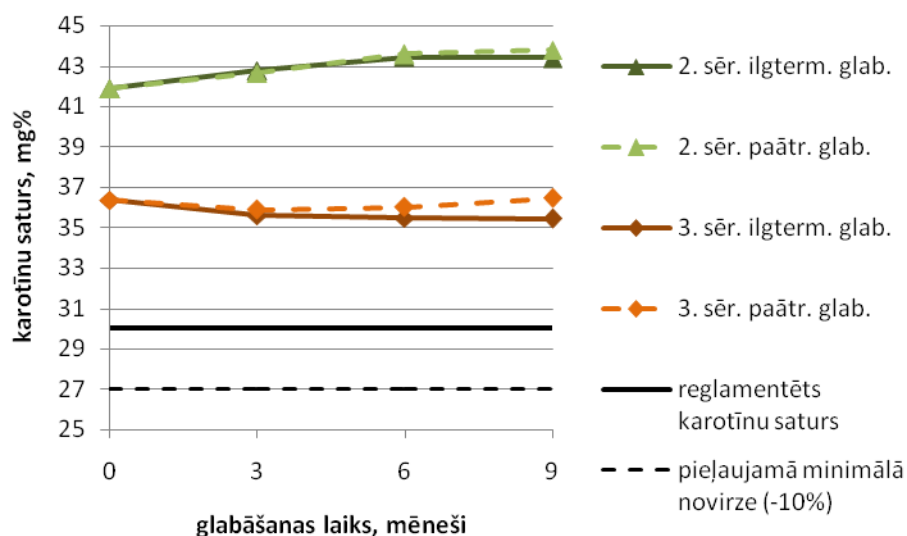
SBE₂ MŽK 2. un 3. pilotsērijas stabilitāte ilgtermiņa glabāšanā un paātrinātā glabāšanā, vērtējot pēc kapsulu sairšanas laika un karotīnu summas satura 9 mēnešu laikā ir parādīta 26. un 27. tabulā un 37., 38. attēlā. 2. un 3. pilotsērijas kvalitāte pēc pagatavošanas bija normas robežās: karotīnu saturs kapsulās bija attiecīgi 41,89 mg % un 36,36 mg %, sairšanas laiks robežās no 17 līdz 20 min. Pēc 9 mēnešu ilgtermiņa un paātrinātās glabāšanas abu sēriju kapsulu kvalitāte bija normas robežās. Šo sēriju stabilitātes pētījumi turpinās.

26. tabula. 2. pilotsērijas SBE₂ MŽK stabilitāte

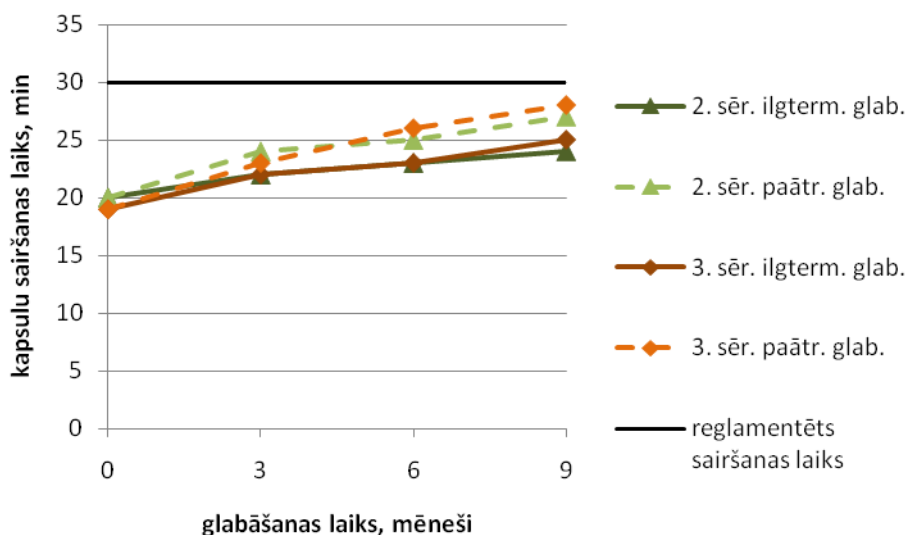
Glabāšanas laiks	Ilgtermiņa glabāšana (25 ± 2) °C		Paātrinātā glabāšana (30 ± 2) °C	
	Karotīnu saturs, mg % (vid. ± SD, n = 3)	Sairšanas laiks, min (n = 6)	Karotīnu saturs, mg % (vid. ± SD, n = 3)	Sairšanas laiks, min (n = 6)
Kvalitātes specifikācija	NMP 30	NVP 30	NMP 30	NVP 30
Pirms glabāšanas	41,89±1,13	18 – 20	41,89±1,13	18 – 20
3 mēneši	42,77±1,38	20 – 22	42,64±1,73	22 – 24
6 mēneši	43,43±1,16	20 – 23	43,58±1,36	23 – 25
9 mēneši	43,39±1,39	21 – 24	43,80±2,63	25 – 27

27. tabula. 3. pilotsērijas SBE₂ MŽK stabilitāte

Glabāšanas laiks	Ilgtermiņa glabāšana (25 ± 2) °C		Paātrinātā glabāšana (30 ± 2) °C	
	Karotīnu saturs, mg % (vid. ± SD, n = 3)	Sairšanas laiks, min (n = 6)	Karotīnu saturs, mg % (vid. ± SD, n = 3)	Sairšanas laiks, min (n = 6)
Kvalitātes specifikācija	NMP 30	NVP 30	NMP 30	NVP 30
Pirms glabāšanas	36,36±0,43	17 – 19	36,36±0,43	17 – 19
3 mēneši	35,59±0,43	20 – 22	35,89±0,41	21 – 23
6 mēneši	35,46±0,84	21 – 23	36,01±0,31	23 – 26
9 mēneši	35,45±0,68	22 – 25	36,44±0,15	26 – 28



37. attēls. Karotīnu saturs 2. un 3. pilotsērijas SBE₂ MŽK



38. attēls. 2. un 3. pilotsērijas SBE₂ MŽK sairšanas laiks

3.3.3. SBE₂ MŽK ražošanas sēriju stabilitāte

SBE₂ MŽK ražošanas sēriju stabilitātes pētījumi veikti, glabājot paraugus klimatokamerās ilgtermiņa glabāšanā (25 ± 2 °C / (60 ± 5) % RM un paātrinātā glabāšanā stresa apstākļos (30 ± 2 °C / (65 ± 5) % RM, kas ļāva novērtēt mitruma ietekmi uz dozēto formu stabilitāti. Iegūti stabilitātes pētījumu rezultāti, glabājot dozētas formas 6 mēnešus (skat. 8. un 9. pielikumu). Šo ražošanas sēriju stabilitātes pētījumi turpinās.

Vērtējot dozēto formu stabilitāti, konstatēts, ka ABPE konteineros ar ZBPE vākiem iepakotās kapsulas saglabāja stabilitāti visā pārbaudes periodā ilgtermiņa glabāšanā un glabājot stresa apstākļos. Kapsulu ārējais izskats un dozēšanas viendabīgums saglabājās reglamentēto normu robežās.

Al/PVH blisteros iepakoto kapsulu ārējais izskats pēc 3 mēnešu glabāšanas klimatokamerās saglabājās reglamentēto normu robežās, vienīgi kapsulu apvalki bija nedaudz mīkstāki $(25 \pm 2) ^\circ\text{C} / (60 \pm 5) \% \text{ RM}$ un mīkstāki $(30 \pm 2) ^\circ\text{C} / (65 \pm 5) \% \text{ RM}$. Glabājot 6 mēnešu laikā novērotas izmaiņas kapsulu ārējā izskatā: $(25 \pm 2) ^\circ\text{C} / (60 \pm 5) \% \text{ RM}$ kapsulu apvalki kļuva mīkstāki, kapsulas bija nedaudz uzbriedušas, bet $(30 \pm 2) ^\circ\text{C} / (65 \pm 5) \% \text{ RM}$ apvalki kļuva ļoti mīksti un kapsulas uzbriedušas. Šie novērojumi liecina par nepietiekamu kapsulu aizsardzību pret mitrumu Al/PVH blisteru iepakojumā. Kapsulu dozēšanas viendabīgums saglabājās reglamentēto normu robežās.

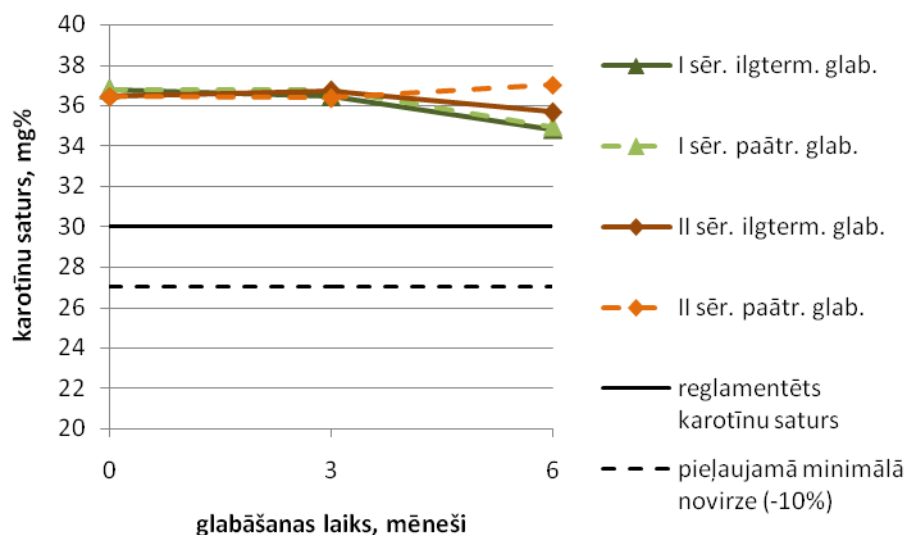
SBE₂ saturošo MŽK ražošanas sēriju stabilitāte ilgtermiņa glabāšanā un paātrinātā glabāšanā, vērtējot pēc kapsulu sairšanas laika un karotīnu summas satura, ir parādīta 28., 29. tabulā un 39., 40. attēlā. Abu ražošanas sēriju kvalitāte pēc pagatavošanas bija normas robežās: karotīnu saturs kapsulās bija attiecīgi 36,78 mg % un 36,45 mg %, sairšanas laiks robežās no 17 līdz 20 min. Pēc 6 mēnešu ilgtermiņa un paātrinātās glabāšanas karotīnu saturs abu sēriju kapsulās bija reglamentētas normas robežās, bet sairšanas laiks palielinājās līdz 35 min kapsulām, kuras bija iepakotas Al/PVH blisteros un glabājās stresa apstākļos. Šāda sairšanas laika pagarināšanās arī ir saistīta ar mitruma un paaugstinātās temperatūras ietekmi uz kapsulu stabilitāti.

28. tabula. I ražošanas sērijas SBE₂ MŽK stabilitāte

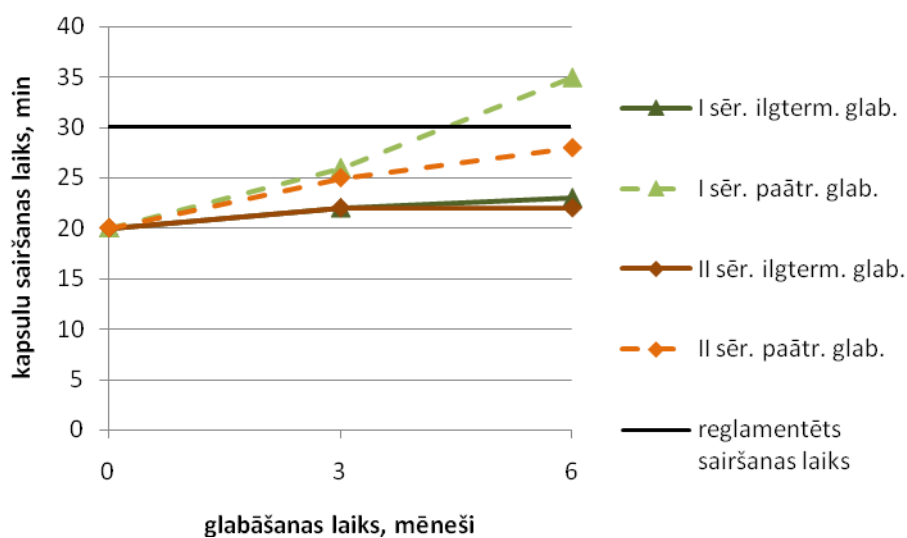
Glabāšanas laiks	Ilgtermiņa glabāšana ($25 \pm 2) ^\circ\text{C} / (60 \pm 5) \% \text{ RM}$		Paātrinātā glabāšana ($30 \pm 2) ^\circ\text{C} / (65 \pm 5) \% \text{ RM}$	
	Karotīnu saturs, mg % (vid. $\pm$ SD, n = 3)	Sairšanas laiks, min (n = 6)	Karotīnu saturs, mg % (vid. $\pm$ SD, n = 3)	Sairšanas laiks, min (n = 6)
Kvalitātes specifikācija	NMP 30	NVP 30	NMP 30	NVP 30
Pirms glabāšanas	36,78 $\pm$ 0,52	17 – 20	36,78 $\pm$ 0,52	17 – 20
3 mēneši	36,45 $\pm$ 0,90	20 – 22	36,75 $\pm$ 1,20	24 – 26
6 mēneši	34,83 $\pm$ 0,71	21 – 23	34,96 $\pm$ 0,09	28 – 35

29. tabula. II ražošanas sērijas SBE₂ MŽK stabilitāte

Glabāšanas laiks	Ilgttermiņa glabāšana (25 ± 2) °C / (60 ± 5) % RM		Paātrinātā glabāšana (30 ± 2) °C / (65 ± 5) % RM	
	Karotīnu saturs, mg % (vid. ± SD, n = 3)	Sairšanas laiks, min (n = 6)	Karotīnu saturs, mg % (vid. ± SD, n = 3)	Sairšanas laiks, min (n = 6)
Kvalitātes specifikācija	NMP 30	NVP 30	NMP 30	NVP 30
Pirms glabāšanas	36,45±0,93	18 – 20	36,45±0,93	18 – 20
3 mēneši	36,71±0,80	20 – 22	36,36±0,37	23 – 25
6 mēneši	35,66±0,74	20 – 22	37,02±0,26	24 – 28



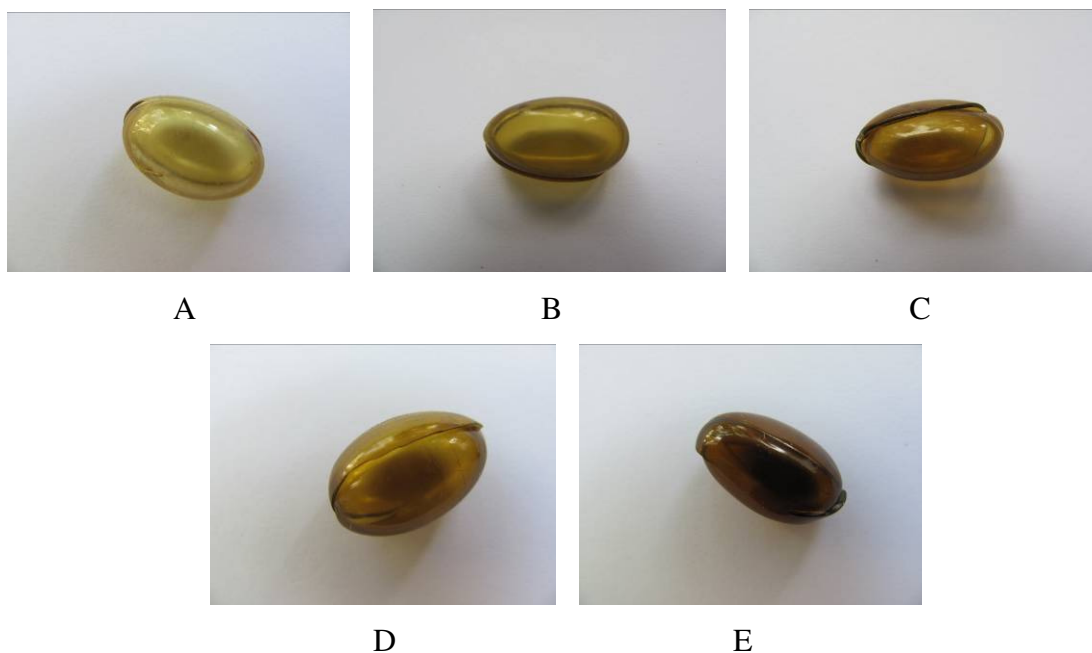
39. attēls. Karotīnu saturs ražošanas sēriju SBE₂ MŽK



40. attēls. Ražošanas sēriju SBE₂ MŽK sairšanas laiks

3.3.4. Iepakojuma ietekme uz SBE₂ MŽK stabilitāti

Veicot kapsulu kvantitatīvo analīzi un dozēšanas viendabīguma pārbaudi konstatēts, ka, atkarībā no iepakojuma veida un glabāšanas apstākļiem atšķīrās kapsulu apvalku krāsa. Svaigi pagatavotām kapsulām apvalks ir caurspīdīgs, gaiši brūngani dzeltens. Glabāšanas laikā tas kļūst tumšāks, zaļganbrūns. Krāsas intensitāte bija lielāka apvalkiem no kapsulām, kuras glabātas stresa apstākļos (30 ± 2) °C / (65 ± 5) % RM, salīdzinot ar kapsulām, kuras glabātas (25 ± 2) °C / (60 ± 5) % RM. Pie kam tumšāki apvalki bija blisteros iepakotām kapsulām (skat. 41. att.).



41. attēls. SBE₂ MŽK apvalki pēc pildījuma atdalīšanas:

- A. apvalks pirms uzglabāšanas;
- B., C. apvalki pēc kapsulu glabāšanas (25 ± 2) °C / (60 ± 5) % RM 6 mēnešus:
 - B. ABPE konteinerā; C. Al/PVC blisterī;
- D., E. apvalki pēc kapsulu glabāšanas (30 ± 2) °C / (65 ± 5) % RM 6 mēnešus:
 - D. ABPE konteinerā; E. Al/PVH blisterī.

3.3.5. SBE₂ MŽK sairšanas īpatnības

Stabilitātes pētījumu gaitā, veicot kapsulu sairšanas laika noteikšanu, ir konstatēts, ka kapsulu sairšanas laiks ūdens vidē pagarinās atkarībā no kapsulu glabāšanas laika un apstākļiem. Kapsulu sairšanas gaitā novērota plānas plēvītes (membrānas) esamība apkārt kapsulas pildījumam, kura neļāva kapsulas saturam izdalīties sairšanas vidē, neskatoties uz to, ka kapsula ūdenī 37 °C temperatūrā ir uzbriedusi un deformējusies. 30. tabulā ir aprakstītas,

bet 42. attēlā ir redzamas atsevišķas SBE₂ MŽK sairšanas stadijas ūdens vidē; kapsulas glabātas klimatokamerā 6 mēnešus.

Kapsulas iepakotas ABPE konteineros, $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ / $(60 \pm 5) \% \text{ RM}$



5 min



10 min



15 min

Kapsulas iepakotas Al/PVH blisteros, $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ / $(60 \pm 5) \% \text{ RM}$



5 min



10 min



15 min



20 min

Kapsulas iepakotas ABPE konteineros, $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$ / $(65 \pm 5) \% \text{ RM}$



5 min



10 min



15 min



20 min

Kapsulas iepakotas Al/PVH blisteros, $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$ / $(65 \pm 5) \% \text{ RM}$



10 min



20 min



30 min



35 min

42. attēls. SBE₂ MŽK sairšana ūdens vidē 37 °C temperatūrā pēc glabāšanas klimatokamerā 6 mēnešus

30. tabula. SBE₂ MŽK sairšana ūdens vidē 37 °C temperatūrā pēc glabāšanas klimatokamerā

Sairšanas laiks, min	Ilgttermiņa glabāšana (25 ± 2) °C / (60 ± 5) % RM		Paātrinātā glabāšana (30 ± 2) °C / (65 ± 5) % RM	
	ABPE konteineri ar ZBPE vākiem	Al/PVH blisteri	ABPE konteineri ar ZBPE vākiem	Al/PVH blisteri
5	Kapsulas uzbrīst	Kapsulas nedaudz uzbrīst	Kapsulas nedaudz uzbrīst	Kapsulas minimāli uzbrīst
10	Kapsulas palielinās izmēros, deformējas	Kapsulas palielinās izmēros, deformējas	Kapsulas palielinās izmēros, sāk deformēties	Kapsulas uzbrīst, palielinās izmēros
15	Kapsulas plīst, no tām iziet pildījums	Kapsulas sāk plīst	Kapsulas deformējas	Kapsulas sāk deformēties
20	Visu kapsulu pildījums sairst	No kapsulām iziet pildījums	Kapsulas sāk plīst, no kapsulām iziet pildījums	Kapsulas deformējas
25	Uz sietīņiem paliek kapsulu apvalku fragmenti	Visu kapsulu pildījums sairst	Visu kapsulu pildījums sairst	Kapsulas sāk plīst
30	Uz sietīņiem paliek kapsulu apvalku nelieli fragmenti	Uz sietīņiem paliek kapsulu apvalku fragmenti	Uz sietīņiem paliek kapsulu apvalku fragmenti	No dažām kapsulām iziet pildījums
35	-	-	-	Visu kapsulu pildījums sairst, uz sietīņiem paliek kapsulu apvalku lieli fragmenti

Sairšanas laika pagarināšanās bija izteiktāka Al/PVH blisteros iepakotām kapsulām, salīdzinājumā ar kapsulām no ABPE konteineriem. Tāpat, lielāka sairšanas laika pagarināšanās bija novērojama kapsulām, kuras glabātas stresa apstākļos (30 ± 2) °C / (65 ± 5) % RM.

Pārbaudīta SBE₂ MŽK sairšana mākslīgajā zarnu šķīdumā (fosfātu buferšķīdumā ar pH 6,8 un pankreatīnu [128]) (37 ± 0,5) °C temperatūrā pēc glabāšanas Al/PVH blisteros klimatokamerā (30 ± 2) °C / (65 ± 5) % RM 6 mēnešus. Konstatēts, ka šādā vidē sairšana notiek ātrāk un pilnīgāk: kapsulu pildījums sairst 15 min laikā, apvalki pilnīgi sairst 20 min laikā.

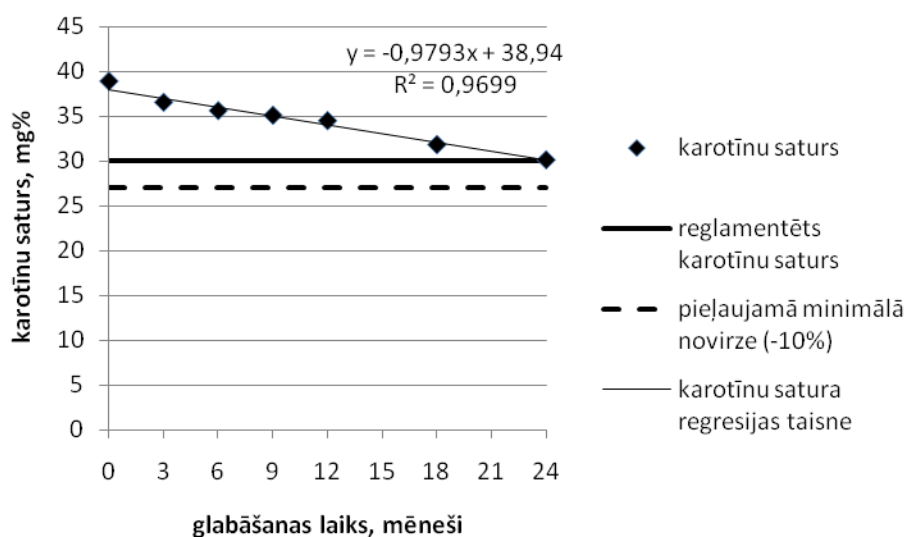
3.3.6. SBE₂ MŽK uzglabāšanas laika prognozēšana

43. un 44. attēlā redzama karotīnu satura un sairšanas laika izmaiņu dinamika ilgtermiņa glabāšanā SBE₂ MŽK laboratorijas sērijai, 45. un 46. attēlā – 1. pilotsērijai. Abām sērijām ir pabeigti stabilitātes pētījumi.

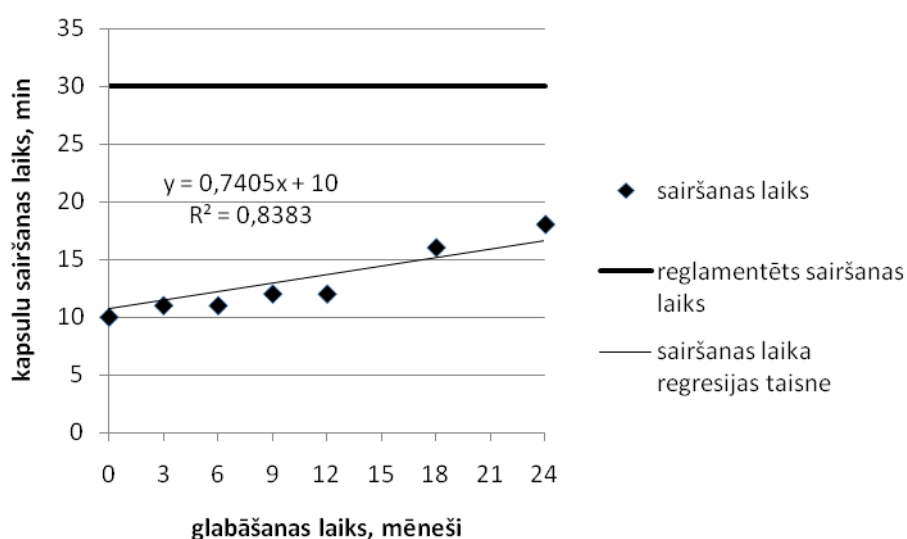
Analizējot līknes, var secināt, ka laboratorijas sērijas kapsulās ilgtermiņa glabāšanā 24 mēnešu laikā notiek karotīnu satura samazināšanās par 22,65 %, tomēr karotīnu saturs

saglabājas reglamentēto normu robežās (NMP 30 mg %). 1. pilotsērijas ilgtermiņa uzglabāšanas 12 mēnešu laikā karotīnu saturs samazinās par 26,37 %, bet, ekstrapolējot uz 24 mēnešiem (8 laika intervāliem pa 3 mēnešiem), karotīnu saturs glabāšanas termiņa beigās aprēķināts: $y = a + bx = -1,0484 \cdot 8 + 22,03 = 13,64$ mg %, un kopumā karotīnu satura samazināšanās par 38,08 %.

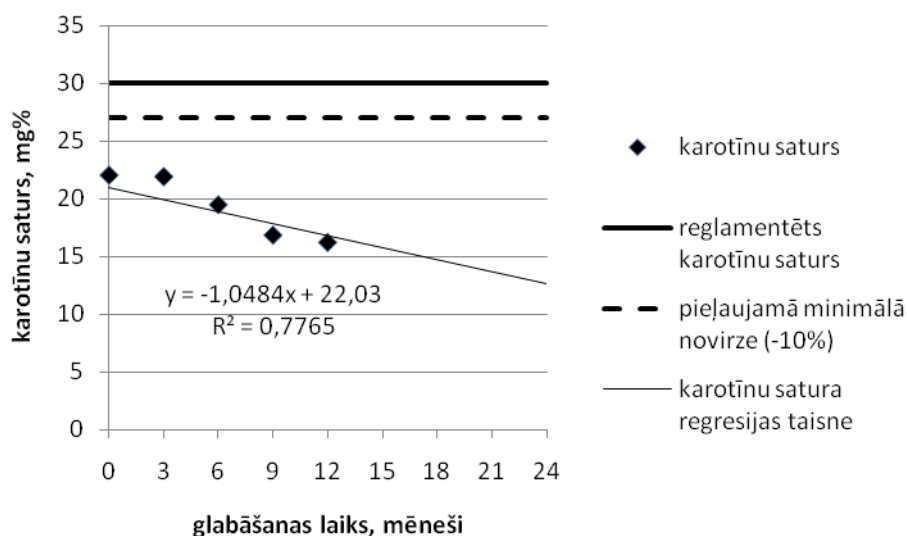
Laboratorijas sērijas kapsulu sairšanas laiks 24 mēnešu laikā saglabājas normas robežās (NVP 30 min) un perioda beigās sasniedza 18 min. 1. pilotsērijas kapsulu sairšanas laiks pēc 12 mēnešu glabāšanas bija 30 min un, ekstrapolējot uz 24 mēnešiem, aprēķināts: $y = a + bx = 1,8909 \cdot 8 + 20 = 35,13 \approx 35$ min.



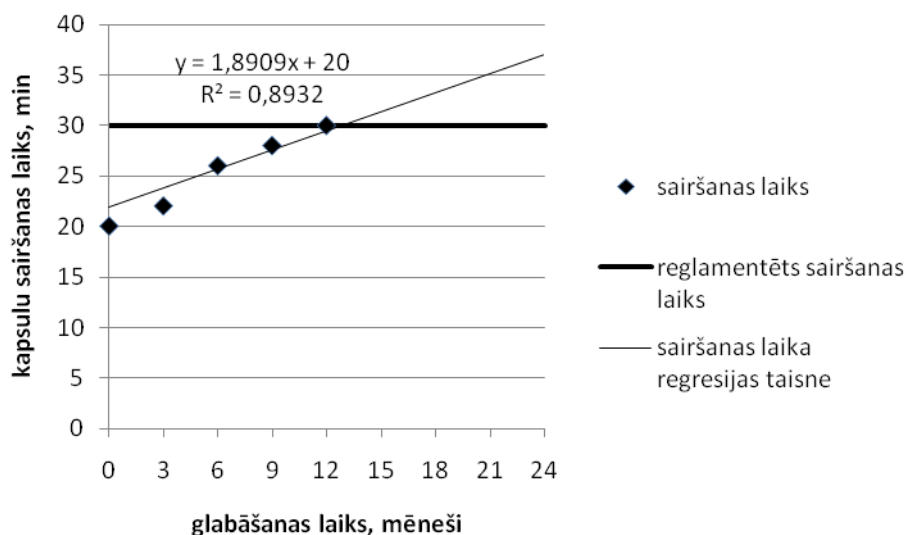
43. attēls. Karotīnu saturs laboratorijas sērijas SBE₂ MŽK ilgtermiņa glabāšanā



44. attēls. Laboratorijas sērijas SBE₂ MŽK sairšanas laiks ilgtermiņa glabāšanā



45. attēls. Karotīnu saturs 1. pilotsērijas SBE₂ MŽK ilgtermiņa glabāšanā



46. attēls. 1. pilotsērijas SBE₂ MŽK sairšanas laiks ilgtermiņa glabāšanā

Sakarā ar to, ka 1. pilotsērijas kvalitāte neatbilda prasībām uzreiz pēc pagatavošanas, un ilgtermiņā stabilitātes pētījumi šai sērijai ilga 12 mēnešus, par uzglabāšanas laika aprēķina modeli izmantoti laboratorijas sērijas stabilitātes pētījuma rezultāti.

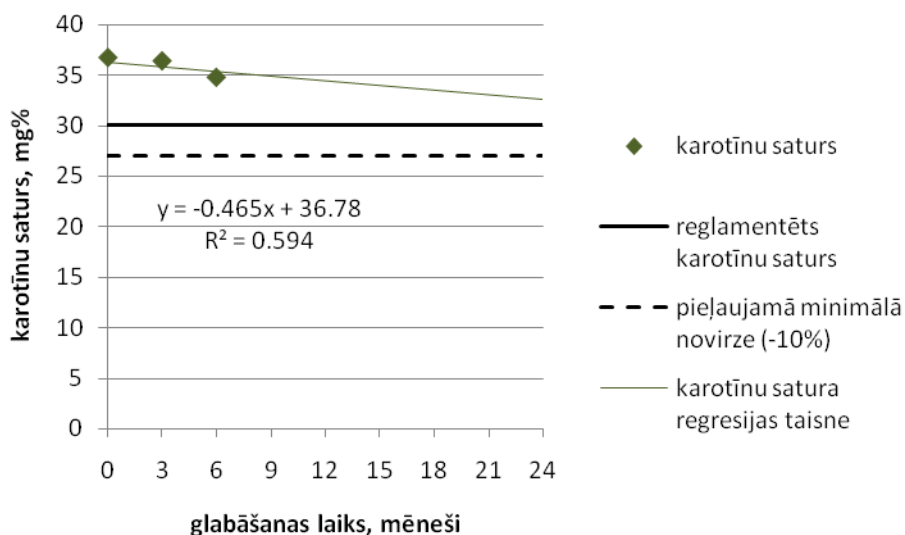
Aprēķināta SBE₂ MŽK karotīnu satura minimālā robeža, kādai jābūt izejvielā un produktā uzreiz pēc pagatavošanas:

$$a = y - bx = 27 - (-0,9793 \cdot 8) = 34,83 \text{ mg \% } (\sim 35 \text{ mg \%}).$$

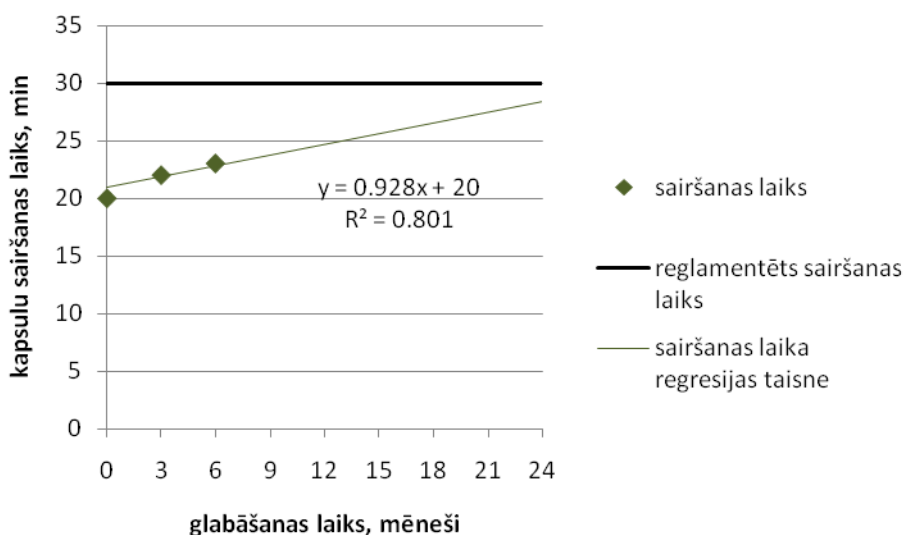
2. un 3. pilotsērijas un ražošanas sēriju kvalitāte atbilst šim rādītājam (karotīnu saturs no 36,36 – 41,89 mg %).

Prognozējot 2. un 3. pilotsērijas un ražošanas sēriju kvalitāti ilgtermiņa stabilitātes pētījumu beigās, ar ekstrapolāciju aprēķināts sagaidāmais karotīnu saturs un sairšanas laiks I ražošanas sērijai pēc 24 mēnešu glabāšanas. Šajā sērijā novērota straujāka karotīnu satura samazināšanās 6 mēnešu laikā, salīdzinot ar II ražošanas sēriju un 2. un 3. pilotsēriju.

Ekstrapolējot, karotīnu saturs glabāšanas termiņa beigās I ražošanas sērijā sagaidāms: $y = a + bx = -0,465 \cdot 8 + 36,78 = 33,06 \text{ mg } \%$, bet sairšanas laiks varētu sasniegt: $y = a + bx = 0,928 \cdot 8 + 20 = 27,42 \approx 27 \text{ min}$ (skat. 47. un 48. att.).



47. attēls. Karotīnu saturs I ražošanas sērijas SBE₂ MŽK ilgtermiņa glabāšanā



48. attēls. I ražošanas sērijas SBE₂ MŽK sairšanas laiks ilgtermiņa glabāšanā

Var secināt, ka 2. un 3. pilotsērijas un ražošanas sēriju kvalitāte stabilitātes pētījumu laikā saglabājas normu robežās un ir prognozējams SBE₂ MŽK glabāšanas laiks 24 mēneši.

4. DISKUSIJA

4.1. SBE īpašību izpēte, kvalitātes novērtēšana un karotīnu satura noteikšanas metodes izstrāde SBE dozētā formā

SBE ir komplekss preparāts, kas satur daudz dažādu BAV: hlorofilus un to atvasinājumus, karotinoīdus, taukos šķīstošos vitamīnus (E, K), sterīnus, poliprenolus, terpēnus, nepiesātinātās augstākās taukskābes u.c. savienojumus [6, 7, 59, 60]. Bija svarīgi izpētīt SBE, kā aktīvās substances, fizikāli-ķīmiskās īpašības, lai izveidotu efektīvu un stabilu dozētu formu un izstrādātu tās kvalitātes noteikšanas metodes.

Kā vienus no vairāk izpētītajiem priežu skuju sastāvā esošiem savienojumiem var minēt pigmentus: hlorofilus un karotinoīdus. Šie savienojumi SBE sastāvā varētu kalpot par marķieriem, kuri norādītu uz ekstrakta un tā dozēto formu kvalitāti kopumā [2, 253].

SBE iegūšanas procesā priežu skuju zaleņa apstrādē ir vairākas operācijas, kurās notiek termiska apstrāde un apstrāde ar sārmainajiem reaģentiem. Skujkoku zaleņa tehnoloģiskais process neizbēgami ir saistīts ar pigmentu ķīmiskajām pārvērtībām un zudumiem [254]. Ir ziņots, ka skujkoku zaleņa ekstrakcijas ar benzīnu, vaskveida vielu atdalīšanas un apstrādes ar sārmu rezultātā zūd apmēram 20 % no zaļajiem pigmentiem, bet no hlorofiliem veidojas feofitīns, feoforbīds, hlorofilīds, hlorīns un to atvasinājumi [56, 249]. Karotinoīdi pakļauti trans-cis izomerizācijai un oksidēšanās procesiem, tas īpaši attiecas uz ļoti nepiesātinātiem savienojumiem [70]. Literatūrā ir dati, ka, veicot ekstrakciju rūpnieciskajā ražošanā, vairāk par 50 % karotinoīdu iet zudumā [71]. Tāpēc, vērtējot SBE kvalitāti, jāņem vērā tas, ka priežu skuju sastāvā esošie savienojumi ekstraktā var būt to atvasinājumu un degradācijas produktu veidā. Tāpat, artefakti (piem., epoksikarotinoīdi) var rasties paraugu sagatavošanas un analīzes gaitā [70].

SBE₁ un SBE₂ kvalitatīvajai analīzei tiek izmantotas krāsu reakcijas, kā arī plānslāņa hromatogrāfijas metode SBE₁ analīzei [234].

Mūsu pētījumā šī PSH metode ir pārbaudīta un precizēta, lai to varētu izmantot SBE₂ kvalitātes vērtēšanai. SBE₂ sastāvā esošo karotīnu identifikācijai pārbaudītas literatūrā norādītās šķīdinātāju sistēmas, hromatografējot augšupejošā virzienā uz silikagela [237–240]. Ar dažiem izņēmumiem karotinoīdi ir lipofīli. Tie nešķīst ūdenī, bet šķīst organiskajos šķīdinātājos, tādos kā acetons, spirti, ēteris, hloroforms, etilacetāts. Karotīni viegli šķīst petrolēterī, heksānā un toluolā; ksantofili labāk šķīst metanolā un etilspirtā [70]. Kā piemērotas β-karotīna atdalīšanai no pārējiem SBE₂ sastāvā esošiem pigmentiem var uzskatīt

mūsu pētījumā izmantotās šķīdinātāju sistēmas heksāns – ēteris (80 : 20), petrolēteris – acetons (94 : 6), petrolēteris – ēteris (90 : 10) un (95 : 5), petrolēteris – hloroforms (75 : 25) (skat. 5. tab., 12. att.), jo šajās sistēmās no pigmentiem virzās tikai β -karotīns, hlorofila atvasinājumi un citi karotinoīdi paliek uz starta līnijas, un R_f ir intervālā no 0,6 līdz 0,9.

SBE₂ sastāvā esošo komponentu sadalīšanai var izmantot šķīdinātāju sistēmu benzols – etilacetāts (77 : 23), kurā iegūtajā hromatogrammā dienas gaismā redzamas 4 zonas, bet UV gaismā – 7 zonas. No dienas gaismā redzamajām zonām viena tika identificēta kā β -karotīns (ar standartu), otra kā hlorofila savienojums (zaļa krāsa, sārtā fluorescence), trešā, iespējams, ir hlorofila atvasinājumi, kas pārklājas ar karotinoīdiem vai fenolsavienojumiem (zaļgandzeltena krāsa, sārti-violeta fluorescence) un ceturtā, iespējams, karotinoīdi (dzeltena krāsa) (skat. 10. att.). Tomēr, labāk izvairīties no benzola izmantošanas analīžu veikšanai, ja ir iespējams izmantot citus mazāk toksiskus šķīdinātājus. Kaut gan, literatūrā samērā bieži minēts par benzola izmantošanu šķīdinātāju sistēmās karotinoīdu noteikšanai plānslāņa hromatogrāfijā [68, 239, 240, 255].

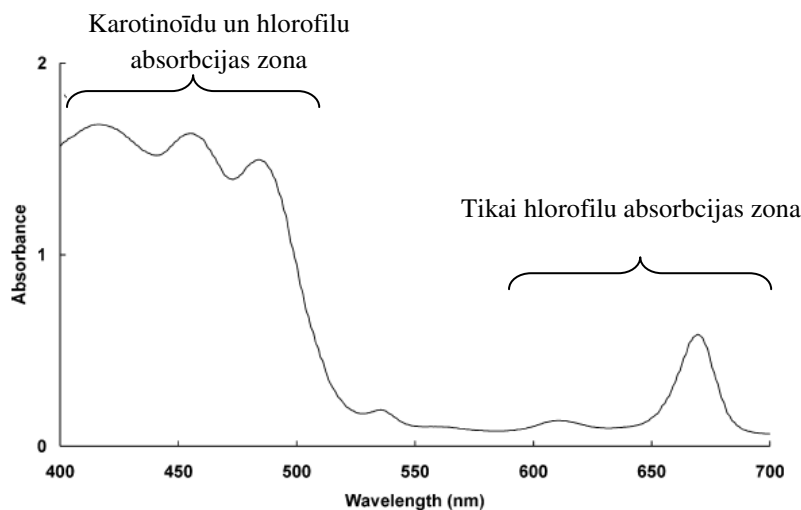
Šķīdinātāju sistēmā hloroforms-etanols (99 : 1) iegūtajā hromatogrammā dienas gaismā redzamas 3 zonas, bet UV gaismā – 5 zonas. No dienas gaismā redzamajām zonām viena tika identificēta kā β -karotīns (ar standartu), otra kā hlorofila savienojums (zaļa krāsa, sārtā fluorescence), trešā, iespējams, karotinoīdi (dzeltena krāsa), viena zona fluorescē gaiši zilā krāsā, kas var tikt identificēta kā fenolkarbonskābes (skat. 11. att.).

Hromatogrāfiju apstrāde ar 10 % fosformolibdēnskābes etilspirta šķīdumu karotinoīdu zonu attīstīšanai, kā norādīts literatūrā [237], mūsdiā nav nepieciešama, jo šī reakcija nav specifiska (skat. 12. att.) [255]. Šo reakciju parasti izmanto lipīdu, steroīdu un antioksidantu atklāšanai [240]. Tās pamatā ir oksidēšanās-reducēšanās process, kurā karotinoīdu un nepiesātināto ogļūdeņražu klātienē molibdāts reducējas, veidojot molibdēnzilo. Zonu attīstīšana nav nepieciešama arī tāpēc, ka karotīni labi identificējami pēc krāsas, apskatot hromatogrammu dienas gaismā.

SBE₁ un SBE₂ kvantitatīvai analīzei izmanto karotīnu satura noteikšanu ar spektrofotometrisko metodi pie viļņa garuma 450 nm pēc karotīnu izdalīšanas no ekstrakta, vai no to saturošiem preparātiem ar kolonnas hromatogrāfiju uz sorbenta alumīnija oksīda, eluējot ar Nefrāzi [234, 235]. Tajā pašā laikā kolonnas hromatogrāfija un spektrofotometrija var tikt izmantota pigmentu identifikācijai [68, 70, 248, 256].

SBE₂ 0,5 % šķīduma hloroformā gaismas absorbcijas spektrs viļņu garumā 300 – 700 nm parādīja augu zaļo un dzelto pigmentu raksturīgu kopainu ar galvenajiem

maksimumiem $\lambda_{\max}$ 415 nm un 666 nm (skat. 13. att.). Ir zināms, ka viļņu diapazonā 400 – 700 nm notiek augu pigmentu: hlorofila *a* un *b*, to atvasinājumu un karotinoīdu gaismas absorbcija [245]. Hlorofiliem ir divi absorbcijas diapazoni: I – 400 – 500 nm un II – 600 – 700 nm, bet karotinoīdiem – viens diapazons 400 – 500 nm (skat. 49. att.) [82]. Tāpēc šie pigmenti tiek sadalīti ar kolonnas hromatogrāfijas palīdzību.

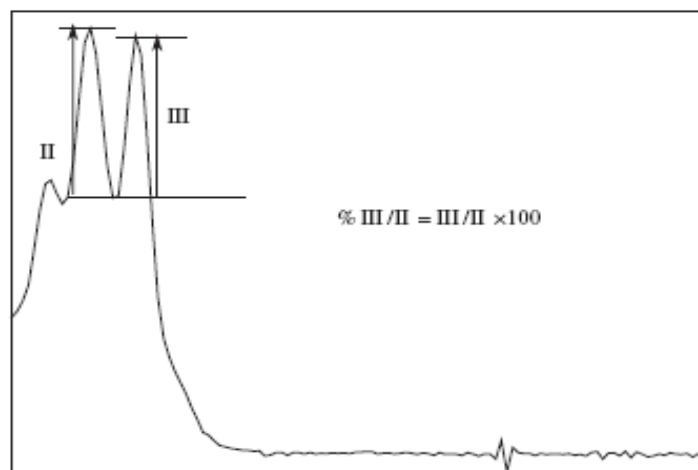


49. attēls. Hlorofilu un karotinoīdu absorbcijas spektrs [82]

Kolonnas hromatogrāfijā absorbcijas afinitāte ir atkarīga no savienojumu konjugēto dubulto saišu skaita, ciklizācijas un skābekli saturošu atvasinājumu klātbūtnes. Absorbcijas maksimumu viļņu garums un spektra struktūra ir raksturojoši hromoforiem [70]. Izmantojot SBE₂ sastāvā esošo pigmentu eluēšanai šķīdinātājus ar pieaugošu polaritāti, iegūtas 5 frakcijas, kurām uzņemts gaismas absorbcijas spektrs.

Eluējot karotinoīdus ar Nefrāzi, pirmie eluējas oranždzeltenas krāsas karotīni (t.sk. β -karotīns), tiem seko spilgti dzeltenas krāsas karotīni, bet spilgti gaiši dzeltenas krāsas josla paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem (skat. 14. att.). Ir zināms, ka karotīni alumīnija oksīda kolonnā ar petrolēteri eluējas šādā secībā: α -karotīns, β -karotīns, ζ -karotīns, δ -karotīns, γ -karotīns [70], bet citi karotinoīdi (t.sk. ksantofili) paliek kolonnas augšdaļā [238, 241].

Vairākam karotinoīdu spektrā ir trīs maksimumi, un, jo lielāks ir konjugēto dubulto saišu daudzums, jo lielāks ir $\lambda_{\max}$. Spektra struktūru raksturo III $\lambda_{\max}$ garuma attiecība pret II $\lambda_{\max}$ garumu, izteikta %, par nulles punktu ņemot minimumu starp abiem maksimumiem (%III/II) (skat. 50. att.) [70, 257]. Karotinoīdu savienojumu funkcionālo grupu ietekme uz adsorbcijas afinitāti pieaug sekojošā secībā: -OR < -C=O < 2 [-C=O] < -OH < -COOH [70].



50. attēls. Aprēķina %III/II shematiska reprezentācija [257]

Zaļajās lapās ir konstants karotinoīdu sastāvs, kuru bieži min kā hloroplastu karotinoīdu modeli: luteīns (~45 %), β -karotīns (parasti 25 – 30 %), violaksantīns (~15 %) un neoksantīns (~15 %) [71]. Kā minorie karotinoīdi ir zināmi α -karotīns, β -kriptoksantīns, α -kriptoksantīns, zeaksantīns, anteraksantīns un luteīns 5,6-epoksīds [70, 71].

Nemot vērā šīs norādes, secinājām, ka ar Nefrāzi iegūtajā 1. frakcijā ir β -karotīns kopā ar citiem karotīniem, jo šīs frakcijas spektrs (15. att.) ir ļoti tuvs literatūrā norādītajam β -karotīna spektram [56, 70, 246, 247], un klāt varētu būt α -karotīns [56, 70]. Ir zināms, ka β -karotīnam ļoti bieži līdzī iet α - un γ -karotīns, bet ievērojami mazākos daudzumos [70]. Turpinot eluēšanu ar Nefrāzi, iegūta 2. frakcija, kuras gaismas absorbcijas spektrs (skat. 17. att.) ir ļoti līdzīgs 1. frakcijas spektram. Var izteikt pieņēmumu, ka šie, iespējams, ir ksantofili, piem., luteīns [56, 70], β -kriptoksantīns [67, 70], zeaksantīns [56, 70] un anteraksantīns [70]. 3. un 4. frakcijā, kuras tika iegūtas ar Nefrāzi, tai pievienojot attiecīgi 5 % un 10 % dietilētera, gaismas absorbcijas spektrā (skat. 18. un 19. att.) ir hlorofilu atvasinājumi un karotinoīdi, kuru spektri pārklājas zili-violetajā daļā. Tie, iespējams, ir hlorofils *a*, feofitīns *a*, feoforbīds *a*, [56, 245, 248, 249], violaksantīns [56, 70], neoksantīns [70] u.c. 5. frakcija, kura tika iegūta ar Nefrāzi, kas satur 10 % acetona, ir pārstāvēta galvenokārt ar hlorofilu atvasinājumiem (skat. 20. att.) [245, 248, 250].

Lai gan hromatogrāfijas un spektrofotometrijas analīzes datus nevar izmantot kā vienīgus kritērijus karotinoīdu un hlorofilu atvasinājumu analīzē, tie var kalpot par vērtīgu papildus informāciju šo savienojumu izpētē [74].

Kopumā var secināt, ka ar kolonnas hromatogrāfijas metodi, izmantojot alumīnija oksīdu kā sorbentu un Nefrāzi kā eluentu, var sekmīgi atdalīt karotīnus no pārējiem SBE₂

sastāvā esošiem pigmentiem: hlorofiliem un to atvasinājumiem, karotinoīdiem un citiem komponentiem, lai veiktu karotīnu kvantitatīvo noteikšanu, pie kam šī metode ir samērā vienkārša un lēta.

Karotinoīdu summas noteikšana, izmantojot galvenā karotinoīda absorbciju, ir vieglākā metode, kaut gan tā nedod informāciju par konkrētu karotinoīdu saturu. Atsevišķu karotinoīdu analīze ir sarežģīta vairāku iemeslu dēļ, galvenie no kuriem ir tas, ka dabā esošo karotinoīdu ir ļoti daudz, ne visiem ir pieejami standarti, un ka analīzes rezultātā var notikt karotinoīdu molekulu izomerizācija un oksidēšanās [70].

Galvenās problēmas karotinoīdu analīzē ir saistītas ar to nestabilitāti. Neskatoties uz to, kādas analītiskās metodes tiek izmantotas, ir jāveic piesardzības pasākumi, kas izslēdz artefaktu veidošanos un kvantitatīvos zudumus. Tie iekļauj analīzes veikšanu pēc iespējas īsākā laikā, piesardzību no skābekļa, gaismas, augstas temperatūras, izvairīšanos no kontakta ar skābēm. Manipulāciju ātrums un aizsardzība pret gaismu īpaši svarīga, kad strādā ar paraugiem, kas satur hlorofilus, jo to klātbūtnē fotodegradācija notiek īpaši ātri [70].

Nopietna problēma ir karotinoīdu standartu nestabilitāte, kā arī tas, ka standarti ne vienmēr ir pieejami. Literatūrā ir dati, ka par standartu izmantots Sudāns I, sintētiskie karotinoīdi (β -apo-karotenāls, kantaksantīns, ehinenons), bet tie arī ir nestabili [70]. β -karotīna standarta aizvietošanai var izmantot azobenzolu vai kālija dihromātu [238, 242]. SBE analīzē izmantots kālija dihromāts, jo šis savienojums ir stabils un viegli pieejams.

Karotinoīdu kvantitatīvajā analīzē izmanto arī īpatnējos absorbcijas koeficientus $A^{1\%}_{1\text{cm}}$. Kaut gan precīzus īpatnējo absorbcijas koeficientu lielumus konkrētajos šķīdinātājos ir samērā grūti iegūt, jo ne vienmēr karotinoīdi pilnīgi izšķīst tajos [70]. Literatūrā norādīts, ka β -karotīna kvantitatīvajā noteikšanā izmanto $A^{1\%}_{1\text{cm}} = 2592$ [70], bet karotīnu summai izmanto $A^{1\%}_{1\text{cm}} = 2500$ [71, 128, 241]. Tomēr precīzākus rezultātus var iegūt, izmantojot salīdzināšanai standartus, īpaši, ja nav zināms precīzs absorbcijas koeficients konkrētā šķīdinātājā, kā arī samazinās citu faktoru, piem., temperatūras ietekme.

SBE₂ MŽK analīzes veikšanai tika modificēta SBE₁ un SBE₂ tehnisko normatīvu dokumentācijā [234, 235] apstiprinātā karotīnu satura noteikšanas metode (p.2.2.5.1.), jo metodes izpildes gaitā radās problēma, kas saistīta ar stabilas emulsijas veidošanos uz Nefrāzes un ūdens fāzes robežas, vairākas reizes mazgājot Nefrāzes slāni ar ūdeni. Emulsija veidojās tādēļ, ka SBE₁ un SBE₂ satur taukskābju un sveķskābju nātrija sāļus, kas darbojas kā emulgators. Pielietojot šo metodi SBE₂ MŽK analīzei, emulsija veidojās īpaši stabila, jo kapsulu pildījums satur emulgatoru. Salīdzinot ar SBE₁, mitruma daudzums SBE₂ samazināts

līdz 10 %. Šis faktors, kā arī eļļas un emulgatora klātbūtne kapsulu pildījumā, padara šo pildījumu hidrofobu, kas ļauj paraugu uzreiz šķīdināt Nefrāzē, neizmantojot acetonu, un izvairīties no ūdens izmantošanas acetona atdalīšanai analīzes gaitā. Acetona izvilkuma izslēgšana no parauga sagatavošanas procedūras ļauj paātrināt un atvieglot analīzes gaitu, kā arī samazināt karotīnu zudumus parauga sagatavošanas laikā.

Validējot SBE₂ MŽK karotīnu satura noteikšanas metodi, konstatēts, ka metode ir specifiska, jo *placebo* šķīduma gaismas absorbcija 450 nm viļņa garumā ir nenozīmīga; metode ir pietiekoši precīza un atkārtojama: RSD lielums ir 1,58 %; aktīvās vielas atgūstamības vidējais lielums ir $103,72 \pm 1,43$ %, RSD = 1,37 %; lineārai sakarībai starp gaismas absorbciju un aktīvās vielas koncentrāciju šķīdumā nav gadījuma raksturs: $R^2 = 0,995$, $r = 0,998$.

4.2. Palīgvielu un tehnoloģisku paņēmieni pielietošanas iespējas izpēte SBE dozētas formas izveidošanai

SBE kā aktīvai substancei nepiemīt optimālās tehnoloģiskās īpašības. SBE slikta šķīdība ūdenī, etilspirtā vai eļļā, liela viskozitāte apgrūtina dozētas formas tehnoloģisko procesu. No SBE nevar iegūt sauso ekstraktu žāvējot, jo SBE satur sveķveida vielas.

Lai izveidotu SBE dozētu formu, izpētīta iespēja pagatavot pulverveida sastāvus pildīšanai cietajās želatīna kapsulās. Pulverveida sastāvu pagatavošanai izmantots SBE ar mitruma un gaistošo vielu saturu ne vairāk par 40 % – SBE₁. Darbā izmēģināti divi varianti pulverveida masas pagatavošanai. I variants: SBE₁ samaisīšana ar palīgvielām (laktozi), ar neorganiskām aktīvām vielām (magnija oksīdu, kalcijs karbonātu, bismuta subnitrātu, alumīnija hidroksīdu) un augu ekstraktiem (lakricas sauso ekstraktu), kuriem piemīt izteikta antacīda, antiseptiska un pretčūlu aktivitāte (11. tabula, 3. pielikums). II variants: SBE₁ samaisīšana ar pārtikā lietojamām kviešu klijām.

Veicot hromatogrāfisko analīzi pagatavotā kompleksā preparātā I varianta divām sērijām un pārbaudot karotīnu saturu eksperimentālā derīguma laika noteikšanā, konstatēts, ka samazinās karotīnu saturs preparātā (12. tabula). Vizuālā kontrole uzrāda, ka pulvera krāsa visiem pulveru sastāviem mainās no zaļganā uz pelēku. Tas, iespējams, saistīts ar karotīnu un hlorofilu oksidēšanās procesu un iespējamām mijiedarbības reakcijām starp SBE₁ komponentiem un pārējām sastāva vielām [70].

Sakarā ar augstākminēto, lai pagatavotu stabilu SBE₁ dozētu formu, tika izveidoti 4 pulveru sastāvi ar antioksidantu (13. tabula). Veicot pagatavoto sastāvu standartizāciju,

konstatēts, ka pēc pulveru glabāšanas 6 mēnešu laikā karotīnu saturu visos sastāvos nevarēja noteikt. Antioksidanta (nātrija metabisulfīta) pievienošana nav uzlabojusi SBE₁ saturošo dozēto formu stabilitāti.

Pagatavotam II variantā SBE₁ un kliju pulveru maisījumam tika pārbaudīta birstamība pirms pildīšanas cietajās želatīna kapsulās. Lai būtu iespējams pulveri pildīt želatīna kapsulās, bija nepieciešams uzlabot tā birstamību. Birstamības uzlabošanas nolūkā SBE₁ pulverveida masai pievienotas granulu un tablešu tehnoloģijā plaši lietojamās slīdvielas: magnija stearāts, kalcija stearāts, stearīnskābe, talks, kā arī izmantots šo slīdvielu maisījums. Ar slīdvielu palīdzību izdevās paaugstināt SBE₁ un kliju pulverveida masas birstamību, un tika izvēlēts optimālais sastāvs (14. tabula).

Veicot karotīnu satura noteikšanu pulverveida masā, konstatēts, ka tos pulveris nesatur. SBE₁ pulverveida masas gatavošanas laikā zūd karotinoīdi un hlorofils. Acīmredzot, notiek šo vielu oksidēšanās vai arī citas ķīmiska rakstura pārmaiņas [70].

Pagatavoto SBE₁ saturošo pulveru kvalitātes noteikšana deva iespēju novērtēt dažādu palīgvielu un tehnoloģisko metožu piemērojamību SBE₁ saturošu cieto želatīna kapsulu izstrādei.

Tehnoloģiski ir iespējams pagatavot SBE₁ saturošu pulverveida masu, kuru var pildīt cietajās želatīna kapsulās, iegūstot dozētu formu, kā arī šo pulveri var granulēt un presēt tabletēs. Tomēr SBE₁ sastāvi ar magnija oksīdu, kalcija karbonātu, bismuta subnitrātu un kviešu klijām nebija stabili glabāšanas laika periodā. Eksperimentu rezultāti liecina, ka SBE₁ pulverveida maisījumus ar šīm vielām gatavot nav racionāli.

Šajā virzienā, iespējams, var turpināt pētījumus, meklējot citu palīgvielu kombinācijas, jo ir zināms, ka Krievijā ir izstrādāti preparāti *Lesmin* un *Feokarpin*, kuri kā aktīvo substanci satur skuju hlorofila-karotīna pastu, kas pēc sastāva un īpašībām ir līdzīga SBE₁. Preparātā *Lesmin* aktīvā viela ar palīgvielām (mikrokristālisko celulozi un kartupeļu cieti) iestrādāta tablešu, apvalkoto tablešu un cieto kapsulu formā. *Feokarpin* satur skuju hlorofila-karotīna pastu, askorbīnskābi un palīgvielas (mikrokristālisko celulozi, kartupeļu cieti, laktozi) cieto kapsulu un tablešu veidā [61, 258].

SBE dozētas formas izveides pētījumu otrs virziens bija mīksto želatīna kapsulu izstrāde. SBE saturošu mīksto želatīna kapsulu tehnoloģijas izstrādei precizēts ekstraktā pieļaujamais mitruma saturs, palīgvielas un to daudzums, aprobētas dažādas mīksto želatīna kapsulu pagatavošanas metodes.

Izveidojot dozētu formu, ir svarīgi, lai tā saturētu nepieciešamo aktīvās vielas daudzumu jeb devu. SBE₁, kas satur līdz 40 % mitruma un gaistošo vielu, optimālā deva dozējuma vienībā ir 500 mg. Mēģinājumi pagatavot MŽK, kas satur SBE₁ bez palīgvielām, vai sastāvu, kas satur ne mazāk par 50 % SBE₁ kombinācijā ar augu eļļu, vai augu eļļu un emulgatoru (16. tabula), nebija veiksmīgi. Visos gadījumos notika kapsulu deformācija, jo pildījums saturēja lielu mitruma daudzumu. Bet, kā zināms, mitruma saturam pildījumā nevajadzētu pārsniegt kritisko līmeni aptuveni 5 – 10 % [24, 25]. Nebija racionāli samazināt mitruma saturu kapsulas pildījumā atšķaidot SBE₁ ar augu eļļu vairāk par 50 %, jo tad tas samazinātu aktīvās vielas devu, vai arī palielinātu dozētas formas lielumu, kas arī nav vēlams, jo kapsulas lielākas par 1 g ir grūti norīt [259]. Tāpēc SBE₁ mitruma un gaistošo vielu saturs tika samazināts, ekstraktu žāvējot. Laboratorijas apstākļos ir izdevies izžāvēt SBE₁ līdz mitruma un gaistošo vielu zudumam (35,0 – 41,6) %, t.i. gandrīz līdz sausai masai (17. tabula). Tomēr, ražojot rūpnieciski, samazināt SBE₁ mitruma un gaistošo vielu saturu līdz līmenim, kas būtu mazāks par 10 %, ne vienmēr bija iespējams. Tāpēc tālāk darbā tika izmantots SBE₂ ar mitruma un gaistošo vielu saturu ne vairāk par 10 %, kura optimālā deva dozējuma vienībā ir 300 mg.

Lai izveidotu SBE₂ sastāvu pildīšanai MŽK, eksperimentāli bija atrastas piemērotās palīgvielas (18. tabula). SBE₂ ar augu eļļu bez emulgatora neveidoja viendabīgu maisījumu. Emulgatoru tvins-20, Rylo MD 50 Pharma un Rylo AC 19 Pharma izmantošana neveicināja SBE₂ un augu eļļas viendabīga maisījuma iegūšanu. Viendabīgu SBE₂ emulsiju ar augu eļļu veidoja emulgators T-2, Rylo MG 20 Pharma un monoglicerīdi destilētie. Pildīšanai MŽK SBE₂ un augu eļļas maisījuma pagatavošanai izmantots emulgators Rylo MG 20 Pharma (glicerīna monooleāts, GMO), jo tā kvalitāte atbilst Eiropas Farmakopejas prasībām [128]. Laboratorijas apstākļos veiksmīgi izdevās iepildīt SBE₂ sastāvu ar augu eļļu un GMO (30 : 65 : 5) pa 1 g ar iemērķšanas metodi iegūtajās MŽK (19. tabula, 27. attēls).

Pēdējos gados liela uzmanība tiek veltīta perorālām lipīdus saturošām aktīvo vielu piegādes sistēmām, kuras uzlabo slikti šķīstošu vielu biopieejamību [197]. Šādas sistēmas parasti tiek veidotas, izmantojot kā palīgvielas lipīdus, kuri ir sagremojami kuņģa-zarnu traktā (augu eļļas, hidrogenizētas eļļas, no eļļām iegūtie atvasinājumi un VAV) [260–262]. Palīgvielām, kuras pakļaujas gremošanas procesam, ir noteicošā loma aktīvās vielas absorbcijas no dozētas formas ātrumā un pakāpē kuņģa-zarnu traktā [201]. Ir ziņots, ka nesagremojamie lipīdi (piem, minerāleļļas, saharozes poliesteri) samazina aktīvo vielu absorbciju [197]. Perorālo biopieejamību ietekmē arī izmantojamo lipīdu rakstura palīgvielu

sastāvā esošo taukskābju ķēžu garums, piesātinājuma pakāpe un lipīdu klase (taukskābes, monoglicerīdi, diglicerīdi vai triglicerīdi) [260, 263–266].

Veidojot SBE_2 sastāvu pildīšanai MŽK, bija jāatrod piemērotās palīgvielas, kuras veidotu viendabīgu masu ar SBE_2 vielu kompleksu, kurā daži komponenti šķīst ūdenī, daži – eļļā, daži nešķīst ne ūdenī, ne eļļā, kā arī veicinātu kompleksa aktīvo komponentu biopieejamību, jo ir zināms par karotinoīdu sliktu biopieejamību [182]. Ir publicēts pētījums par karotinoīda astaksantīna biopieejamības palielināšanu, inkorporējot to lipīdus saturošajā kompozīcijā, kuras sastāvā ir palmu eļļa, glicerīna mono- un dioleāts un polisorbāts 80 [267].

Sastāvs pildīšanai MŽK pagatavots no SBE_2 , augu eļļas un glicerīna monooleāta un pēc dispersoloģiskās klasifikācijas ir ūdens/eļļā dispersā sistēma, kas satur arī ūdenī un eļļā nešķīstošas daļiņas.

Šādas sarežģītas sistēmas izveidošanā bija jāvadās galvenokārt no eksperimenta rezultātiem, kā teorētisku pamatu izmantojot vispārējus disperso sistēmu iegūšanas principus, proti, ka parasti virsmas aktīvās vielas daba nosaka emulsijas tipu un mazāka ietekme ir abu fāžu daudzumu attiecībai. Elektrolītu un polimēru klātbūtne var ievērojami mainīt VAV darbību emulsijas stabilizēšanā, kā arī veidojamās emulsijas tipu. Ir arī zināms, ka secība un veids, kā tiek samaisīti divu fāžu komponenti, ievērojami ietekmē dispersās sistēmas kvalitāti un stabilitāti [203].

Augu eļļas bieži tiek lietotas kā pildījums MŽK, un emulsijās kā dispersās sistēmas vide [192]. Ziņots, ka augu eļļas MŽK pildījumā uzlabo aktīvo vielu absorbciju [137, 205].

Glicerīna monooleāts (GMO) ir polārais lipīds, kuru bieži izmanto kā emulgatoru pārtikas un farmaceitiskajā rūpniecībā emulsiju ūdens/eļļā veidošanai [128, 207, 208]. Disperģējot GMO ūdenī, tas veido dažādas šķidro kristālu fāzes, t. sk. kubisko fāzi, kas veicina aktīvo vielu absorbciju [207, 212]. GMO tiek izmantots kā pašemulģējošos sistēmu komponents, kas veicina aktīvo vielu biopieejamību [194, 210].

Šādu pašemulģējošos sistēmu priekšrocība ir liels virsmas laukums, kuru izveido mikroemulsijas daļiņas, kas veidotas kā VAV micellas, piepildītas ar solubilizētu eļļu un aktīvo vielu. Šāds liels virsmas laukums atvieglo un paātrina aktīvās vielas pāreju no disperģētas eļļas fāzes zarnu šķīdumā ūdens fāzē, līdz iestājas līdzsvars. Tālāk, kad aktīvā viela tiek aiztransportēta no zarnu šķīduma enterocītu absorbcijas ceļā, līdzsvars ātri atjaunojas ar vielas pieplūdumu no mikroemulsijas daļiņām [24]. Atkarībā no kompozīcijas sastāva, atšķaidoties kuņģa-zarnu traktā, veidojas apmēram no 100 līdz 50 nm un mazāka izmēra lipīdu pilieniņi [192].

Nākamais solis bija izvēlēties SBE_2 sastāvu saturošu MŽK rūpnieciskās ražošanas metodi. Kā pirmā tika izmēģināta pilināšanas (Globex) metode, jo šī metode ir lētāka pateicoties tam, ka kapsulu ražošanas procesā neveidojas želatīna masas atkritumi. Pilināšanas metodes priekšrocība ir bezšuvju kapsulu veidošanās, kurām ir minimāla kapsulu tecēšanas (presēto kapsulu šuvju atvērsnās) iespējamība. Protams, bija jāreķinās ar kapsulu mazo izmēru (būtu jālieto vairākas kapsulas vienā reizē). Tomēr pilināšanas metode principiāli atšķiras no pārējām MŽK ražošanas metodēm, jo kapsulu veidošanās ir atkarīga no virsmas spraiguma starp pildījumu un apvalka materiālu. Kad saskaras divi šķidrumi ar dažādām īpašībām, virsmas spraigums samazina abu šķidrumu kontaktvirsmu, rezultātā veidojas sfēriska forma [138]. Ierobežojumus uzliek pilienveidošanās fizikālie principi, t.i., lai izveidotu sfērisku formu, jābūt optimālam virsmas spraigumam starp pildījumu un apvalka materiālu. Šīm prasībām atbilst ierobežots kapsulās pildāmo masu klāsts, un tas tiek uzskatīts par galveno šīs metodes negatīvo momentu [138, 165]. Acīmredzot, SBE_2 saturošs pildījums sastāvs nebija piemērots šai metodei, jo kapsulu iegūšanas laikā veidojās daudz brāķēto kapsulu, kuras atšķīrās savā starpā pēc formas, izmēra un masas (29. attēls).

MŽK rūpnieciska ražošana visbiežāk tiek veikta, izmantojot presēšanas metodi [165]. Rotējošo presformu metodes priekšrocība ir tāda, ka ir iespējams iegūt dažādas formas un lieluma MŽK. Kapsulu veidošanās nav atkarīga no šķidrumu virsmas spraiguma, un tāpēc šajā procesā nav citu ierobežojumu kapsulu pildījumam, vienīgi tā saderība ar kapsulas apvalku. Kaut gan, ja salīdzina ar pilināšanas metodi, presēšanas metodē veidojas daudz kapsulu apvalka materiāla atkritumu, tāpēc metode ir samērā dārga. Ir arī lielāks risks kapsulu tecēšanai [138].

Ar rotējošo presformu metodi iegūtas 3 pilotsērijas un 2 ražošanas sērijas SBE_2 MŽK (21., 22. tabula, 30. attēls). MŽK pagatavošanai ar presēšanas metodi pildījums saturēja 50 % SBE_2 , 45 % saulespuķu eļļas un 5 % GMO. SBE_2 saturs pildījumā tika palielināts ar mērķi samazināt kapsulas pildījuma masu un attiecīgi kapsulas izmērus. Katra kapsula saturēja 600 mg pildījuma (300 mg SBE_2).

Rūpnieciskajā ražošanā pastāv iespēja pildīt cietajās kapsulās šķidras un mīkstas konsistences pildījumus [136, 187]. Tāpēc laboratorijas apstākļos ir pārbaudīta iespēja pildīt cietajās želatīna kapsulās SBE_2 saturošu sastāvu. Pagatavotās kapsulas atbilda kvalitātes prasībām (20. tabula, 28. attēls). Kā liecina literatūras dati, cieto kapsulu pildīšana ar mīkstas un šķidras konsistences pildījumiem ir perspektīvs kapsulu pildīšanas paņēmiens [174]. Šajā metodē ir iespējams pildīt kapsulās tiksotropus sastāvus, šādas īpašības uzrāda arī SBE_2

maisījums ar GMO un augu eļļu. Kā priekšrocību var minēt to, ka cietās kapsulas nesatur plastifikatoru (piem., glicerīnu) apvalkā, kas samazina iespējamo mijiedarbību ar pildījumu [189].

4.3. SBE₂ dozētas formas stabilitātes izpēte

Farmaceutiskajos preparātos ir svarīga gan to fizikālā, gan ķīmiskā stabilitāte [218].

Kompozīcijas ķīmiskā stabilitāte saistīta galvenokārt ar aktīvās vielas ķīmisko stabilitāti un tās saderību ar citām kompozīcijas sastāvdaļām [124].

No augiem iegūtie preparāti satur dažādas bioloģiski aktīvas vielas un to kombinācijas. Var būt arī kombinācijas no dažādiem augiem un augu preparātiem.

SBE satur ļoti plašu bioloģiski aktīvo savienojumu klāstu, daudzi no kuriem, t.sk. karotinoīdi un hlorofili, ir samērā nestabili paaugstinātās temperatūras, skābekļa, gaismas u.c. faktoru ietekmē. Tomēr šiem savienojumiem ir svarīga loma preparāta iedarbībā, jo, darbojoties kompleksā, tiem piemīt antioksidantu, reparatīvā, baktericīdā, imūnmodulējošā aktivitāte. Tāpēc ir svarīgi, lai šo vielu komplekss pēc iespējas ilgāk saglabātu stabilitāti, kvalitāti un efektivitāti gatavā produkta uzglabāšanas, transportēšanas un lietošanas laikā.

Svarīgākais rādītājs, kas liecina par farmaceutiskā produkta kvalitāti, ir aktīvo vielu kvantitatīvais saturs. Ja augu izcelsmes preparāta sastāvdaļām ir zināma terapeitiskā aktivitāte, izmaiņām to kvantitatīvajā saturā uzglabāšanas laikā nevajadzētu pārsniegt $\pm 5\%$ no deklarētā satura lieluma. Ja augu izcelsmes preparāta sastāvdaļām nav zināma to terapeitiskā aktivitāte, tad šo savienojumu (marķieru) kvantitatīvā satura variācija uzglabāšanās laikā var būt $\pm 10\%$ no sākotnējā deklarētā satura lieluma [268, 269]. Kā jau iepriekš minēts, karotīni ir samērā nestabili savienojumi, un izmaiņas to saturā var liecināt par SBE stabilitāti kopumā. Tāpēc karotīni izmantoti par marķieriem SBE un tā dozētas formas stabilitātes analīzē. Uz karotīnu kā marķieru saturu SBE un to saturošajās dozētajās formās attiecināma $\pm 10\%$ novirze.

Kontrolējot karotīnu saturu katrā sērijā pēc pagatavošanas un stabilitātes pētījumu laikā pēc noteiktiem laika intervāliem, konstatēts, ka SBE₂ MŽK un cieto kapsulu laboratorijas sērijās, SBE₂ MŽK divās pilotsērijās un divās ražošanas sērijās karotīnu saturs saglabājās reglamentēto normu robežās (NMP 30 mg %). Veiktajā darbā konstatēta vienas pilotsērijas kvalitātes neatbilstība prasībām pēc karotīnu satura, kas bija zemāks par reglamentēto normu jau uzreiz pēc pilotsērijas saražošanas (22. tabula). Šāda atšķirība kapsulu kvalitātē varētu būt izskaidrojama ar kapsulās iepildāmā sastāva pagatavošanas laikā

pielietoto maisīšanas ātrumu. Maisīšanas laikā ātrgaitas maisītājā kapsulu pildījuma masā iekļūst daudz gaisa, un molekulārais skābeklis var izraisīt karotīnu oksidēšanos, kas ir viens no farmaceitisko preparātu oksidatīvās degradācijas veidiem [218]. Tāpēc pārējo SBE₂ MŽK sēriju ražošanā izmantota maisīšana ar maziem maisītāja apgriezieniem.

Stabilas un efektīvas kompozīcijas izveidošanā svarīga loma ir palīgvielu un dozētas formas izvēlei, kas uzlabo aktīvās vielas atbrīvošanos un biopieejamību, aizsargā to no degradācijas un atvieglo preparāta ieņemšanu [125].

Gatavā produktā var notikt aktīvās vielas reakcijas ar palīgvielām, palīgvielu sabrukšanas produktiem un palīgvielās esošiem piemaisījumiem [218]. Farmaceitiskie produkti ir kompleksie savienojumi no aktīvām vielām un palīgvielām, tāpēc to fizikālās un ķīmiskās stabilitātes kinētika ir sarežģīta [270]. Kaut gan pētījumi, kuri atspoguļotu ķīmiska rakstura nesaderību starp lipīdu dabas palīgvielām un aktīvām vielām, nav publicēti, ir zināms, ka atsevišķas lipīdu dabas palīgvielas un virsmas aktīvās vielas ir pakļautas oksidēšanās procesiem, veidojot peroksīdus, kuri, savukārt, var reaģēt ne tikai ar aktīvo vielu, bet arī izraisīt krustenisko saišu veidošanos želatīnā, tādējādi pagarinot kapsulu sairšanas laiku [192].

Viens no rādītājiem, kas var liecināt par pārmaiņām produkta kvalitātē, ir ārējais izskats. MŽK glabāšanas laikā jāvērtē iespējamās pārmaiņas gan kapsulas apvalkā, gan pildījumā. Istabas temperatūrā pilnīgi izžāvēto MŽK apvalki salīdzinoši labi aizsargā kapsulu pildījumu no skābekļa iedarbības. Zems mitruma saturs (8 – 10) % neļauj mikrobiem vairoties kapsulas apvalkā [188].

SBE₂ MŽK stabilitātes pētījumos noskaidrots, ka kapsulu ārējais izskats ir atkarīgs no glabāšanas apstākļiem un primārā iepakojuma veida: ABPE konteineros ar ZBPE vākiem vai Al/PVH blisteros.

Stabilitātes pētījumos, kuros temperatūra tika kontrolēta ar termostata palīdzību: ilgtermiņa glabāšanā (25 ± 2) °C, paātrinātā glabāšanā (30 ± 2) °C, nav novērotas pārmaiņas kapsulu ārējā izskatā (skat. 4., 5., 6., 7. pielikumā). Ar iemērķšanas metodi laboratorijas sērijā iegūtās SBE₂ saturošās MŽK saglabāja kvalitāti visu pārbaudes periodu ilgtermiņa glabāšanā ABPE konteineros 24 mēnešus un paātrinātā glabāšanā 12 mēnešus. Vizuāli nebija redzamas izmaiņas kapsulu formā, apvalkā vai pildījumā. Ar SBE₂ saturošu sastāvu pildītās cietās želatīna kapsulas (25 ± 2) °C temperatūrā saglabāja kvalitāti 24 mēnešu laikā. Arī visu pagatavoto pilotsēriju kapsulu ārējais izskats saglabājās reglamentēto normu robežās

neatkarīgi no izmantotā iepakojuma veida 9 mēnešu laikā (vienai sērijai 12 mēnešus; divām pilotsērijām stabilitātes pētījumi turpinās).

SBE₂ MŽK ražošanas sēriju stabilitātes pētījumi veikti, glabājot paraugus klimatokamerās ilgtermiņa glabāšanā (25 ± 2) °C / (60 ± 5) % RM un paātrinātā glabāšanā stresa apstākļos (30 ± 2) °C / (65 ± 5) % RM, kas ļāva novērtēt mitruma un iepakojuma veida ietekmi uz dozēto formu stabilitāti. Iegūti stabilitātes pētījumu rezultāti, glabājot dozētas formas 6 mēnešus (skat. 8., 9. pielikumā).

Vērtējot dozēto formu stabilitāti, konstatēts, ka ABPE konteineros iepakotās kapsulas saglabāja stabilitāti visā pārbaudes periodā ilgtermiņa glabāšanā un glabājot stresa apstākļos. Kapsulu ārējais izskats un dozēšanas viendabīgums saglabājās reglamentēto normu robežās.

Al/PVH blisteros iepakoto kapsulu ārējais izskats pēc 3 mēnešu glabāšanas klimatokamerās saglabājās reglamentēto normu robežās, vienīgi kapsulu apvalki kļuva mīkstāki. Glabājot 6 mēnešus novērotas izteiktākas izmaiņas kapsulu ārējā izskatā: kapsulu apvalki kļuva ļoti mīksti un kapsulas uzbriedušas, tas īpaši attiecas uz glabāšanu stresa apstākļos. Šie novērojumi liecina par nepietiekamu kapsulu aizsardzību pret mitrumu Al/PVH blisteru iepakojumā.

Veicot ražošanas sēriju SBE₂ MŽK kvantitatīvo analīzi un dozēšanas viendabīguma pārbaudi, konstatēts, ka, atkarībā no iepakojuma veida un glabāšanas apstākļiem atšķirās kapsulu apvalku krāsa (41. attēls). Svaigi pagatavotām kapsulām apvalks ir caurspīdīgs, gaiši brūngani dzeltens. Glabāšanas laikā tas kļūst tumšāks, zaļganbrūns. Krāsas intensitāte bija lielāka apvalkiem no kapsulām, kuras glabātas stresa apstākļos, salīdzinot ar kapsulām, kuras glabātas ilgtermiņā. Pie kam tumšāki apvalki bija blisteros iepakotām kapsulām. Al/PVH blisteru iepakojumam ir lielāka mitruma caurlaidība, salīdzinot ar ABPE konteineriem. Ir arī zināms, ka polivinilhlorīds (PVH), polimērs, kuru bieži izmanto zāļu iepakojumam, var mijiedarboties ar dažām aktīvām vielām un palīgvielām [270].

Mitrums var ievērojami ietekmēt aktīvo vielu un dozēto formu stabilitāti, pat ja ūdens neiesaistās ķīmiskajās reakcijās. Tas var izraisīt fizikālās izmaiņas [218], kas arī tika novērots veiktajos pētījumos. Mainoties uzglabāšanas apstākļiem, mainās arī želatīna struktūra apvalkā. Palielinoties temperatūrai un mitrumam, apvalks absorbē mitrumu, un želatīna molekulas saņem papildus kustību brīvību: sākas sola – gela pārvērtības želatīna apvalkā [188]. Palielināta mitruma apstākļos blisteru iepakojumā kapsulu apvalki kļūst mīkstāki, un pildījuma sastāvdaļas var intensīvāk pāriet apvalkā, mainot tā krāsu.

Lai aktīvās vielas uzsūktos un darbotos organismā, tām jāatbrīvojas no dozētas formas, tāpēc liela nozīme ir dozētu formu sairšanas laika noteikšanai. Ar iemērķšanas metodi pagatavotās MŽK sairst ātrāk, salīdzinot ar kapsulām, kuras iegūtas ar presēšanas metodi. Tas ir izskaidrojams ar to, ka iemērķšanas metodē laboratorijas sērijā iegūtām kapsulām ir plānākas sienīņas un ir aizkausējuma vieta, kura atveras ātrāk, kapsulai nokļūstot sairšanas vidē. Presēšanas metodē iegūtām kapsulām sienīņas ir biezākas, jo to nosaka kapsulu tehnoloģiskais process [138]. Sairšanas vidē šādas kapsulas sairst lēnāk, kaut gan bieži pirmā atveras kapsulu šuve, atbrīvojot saturu.

Tomēr, veicot sairšanas laika pārbaudi SBE₂ MŽK, konstatēts, ka kapsulu sairšanas laiks ūdens vidē pagarinās lielākā vai mazākā mērā, atkarībā no kapsulu glabāšanas laika un apstākļiem. Pie kam kapsulu sairšanas gaitā novērota plānas plēvītes (membrānas) esamība apkārt kapsulas pildījumam, kura neļāva kapsulas saturam izdalīties sairšanas vidē, neskatoties uz to, ka kapsula ūdenī 37 °C temperatūrā ir uzbriedusi un deformējusies. Sairšanas laika pagarināšanās bija izteiktāka blisteros iepakotām kapsulām, salīdzinājumā ar ABPE konteineros iepakotām kapsulām. Tāpat, izteiktāka sairšanas laika pagarināšanās bija novērota kapsulām, kuras tika glabātas stresa apstākļos (30 ± 2) °C / (65 ± 5) % RM (30. tabula, 42. attēls).

Novērotā parādība literatūrā ir aprakstīta kā krustenisko saišu veidošanās želatīnā, kas ir raksturīga želatīnam kā polimēru savienojumam. Aldehīdi (kas ir arī SBE sastāvā) reaģē ar ε-aminogrupām (galvenokārt lizīnā) un veido krusteniskas saites želatīna molekulās [224, 225]. Šo procesu pastiprina un paātrina mitrums un paaugstinātā temperatūra [151].

Šī parādība lielākā vai mazākā mērā var ietekmēt kapsulu sairšanas laiku un pat padarīt želatīna kapsulu pilnīgi nesairstošu ūdens vidē. Šādos gadījumos kapsulu sairšanas laika noteikšanai var izmantot sārmaino vidi ar pankreatīnu vai virsmas aktīvo vielu (1 % nātrija laurilsulfāta) [128, 223], kas ir pieļaujams, jo *in vivo* sairšana notiek dažādās kuņģa-zarnu trakta daļās, un sairšanas procesā piedalās fermenti, žults komponenti u.c. faktori [188]. Šo problēmu var risināt arī izmantojot mīksto kapsulu ražošanai ar dzintarskābes anhidrīdu apstrādātu želatīnu [232], vai polisaharīdus saturošu izejvielu (pululānu, termoplastisko cieti) [151, 156, 157].

Kaut arī nevar izdarīt absolūtos secinājumus par paredzamu stabilitāti normālos uzglabāšanas apstākļos no datiem, kuri iegūti stresa apstākļos, šādi testi ļauj samērā ātri optimizēt sastāvus [124]. Paātrinātās stabilitātes noteikšanas testi papildina ilgtermiņa stabilitātes testus ar informāciju par pārbaudāmā farmaceitiskā produkta fizikālām un

ķīmiskām īpašībām. Paātrinātās stabilitātes pētījuma rezultāti ne vienmēr ir ņemami vērā, prognozējot fizikālās vai ķīmiskās pārmaiņas, tomēr tie demonstrē, kādas pārmaiņas var notikt, ja dozēta forma netiek uzglabāta atbilstoši prasībām [215].

Kā jau tika minēts iepriekš, SBE₂ MŽK ārējais izskats un sairšanas laiks glabāšanas procesā bija atkarīgi no iepakojuma veida un glabāšanas apstākļiem (ilgtermiņa glabāšana vai paātrinātā glabāšana). Pamatojoties uz šiem datiem, var secināt, ka SBE₂ MŽK ir stabilākas, uzglabājot ABPE konteineros, salīdzinot ar Al/PVH blisteriem. Tas īpaši attiecas uz glabāšanu stresa apstākļos paaugstinātā temperatūrā un mitrumā. Tāpēc ieteicamais SBE₂ MŽK primārā iepakojuma veids ir ABPE flakoni vai Al/PVH blisteri, uzglabājot temperatūrā līdz 25 °C un sargājot no mitruma un gaismas. Paaugstinātas temperatūras un mitruma apstākļos ieteicamais SBE₂ MŽK primārā iepakojuma veids ir ABPE konteineri vai blisteri no alumīnija folijas un polimēra plēves, kuras sastāvā izmantots polihlortrifluoretilēns vai polivinilidēnhlorīds, kas nodrošina lielāku aizsardzību pret mitrumu [271–273].

Gatavās dozētas formas derīguma termiņa noteikšanai ir jāizmanto vismaz 3 pilotsēriju vai ražošanas sēriju ilgtermiņa stabilitātes pētījuma rezultāti. Prognozējamā derīguma termiņa noteikšanai var izmantot ekstrapolāciju, ja farmaceitiskajā produktā netiek novērotas nopietnas izmaiņas paātrinātās stabilitātes pārbaudes testā [215, 216]. Prognozējot derīguma termiņu, kvantitatīvo stabilitātes datu statistiskai novērtēšanai izmanto regresijas analīzi [216, 217].

Parasti farmaceitisko produktu raksturojošie lielumi (piem., aktīvās vielas saturs) ar laiku samazinās. Gadījumā, ja produktu raksturojošie lielumi ar laiku pieaug (piem., kapsulu sairšanas laiks), tie var tikt analizēti līdzīgi. Ļoti bieži nepārtraukto lielumu izmaiņas, piem., aktīvās vielas satura iespējamo degradāciju, stabilitātes pētījumu analīzē apraksta lineārais modelis [219].

Sakarā ar to, ka SBE₂ MŽK 1. pilotsērijas kvalitāte neatbilda prasībām uzreiz pēc pagatavošanas, bet pārējo pilotsēriju un ražošanas sēriju stabilitātes pētījumi vēl turpinās, par uzglabāšanas laika aprēķina modeli izmantoti laboratorijas sērijas stabilitātes pētījuma rezultāti, vērtējot pēc karotīnu kvantitatīvā satura un kapsulu sairšanas laika (43., 44. attēls). Ar ekstrapolācijas paņēmieni ir analizēta arī ražošanas sērija, kurai stabilitātes pētījumi vēl turpinās (47., 48. attēls).

Ar lineārās regresijas vienādojuma palīdzību aprēķināta SBE₂ MŽK karotīnu satura minimālā robeža, kādai jābūt izejvielā un produktā uzreiz pēc pagatavošanas – 35 mg %. 2. un

3. pilotsērijas un ražošanas sēriju kvalitāte atbilst šim rādītājam (karotīnu saturs no 36,36 – 41,89 mg %). Prognozējamais SBE₂ MŽK derīguma termiņš – 2 gadi.

Pamatojoties uz darbā veiktajiem SBE₂ MŽK dozētas formas organoleptisko, fizikāli-ķīmisko īpašību pētījumiem, stabilitātes pētījumiem, kā arī karotīnu satura kvantitatīvās noteikšanas metodes modifikāciju un validāciju, ir izstrādāts produkta kvalitātes specifikācijas projekts (skat. 10. pielikumā) un kvalitātes kontroles metodes (skat. 11. pielikumā).

5. SECINĀJUMI

1. Veicot skuju biežā ekstrakta sastāva izpēti, noskaidrots, ka karotinoīdi un hlorofili var kalpot par marķieriem, kuri norāda uz ekstrakta un tā dozēto formu kvalitāti kopumā.
Atrastas plānslāņa hromatogrāfijas metodē izmantojamās šķīdinātāju sistēmas, kuras ir piemērotas β-karotīna atdalīšanai no pārējiem skuju biežajā ekstraktā esošajiem pigmentiem, kā arī šķīdinātāju sistēmas ekstrakta sastāvā esošo komponentu sadalīšanai. Noskaidrots, ka ar kolonnas hromatogrāfijas metodi var sekmīgi atdalīt karotīnus no pārējiem skuju biežajā ekstraktā esošajiem karotinoīdiem, hlorofiliem un to atvasinājumiem, un citiem komponentiem, lai veiktu karotīnu kvantitatīvo noteikšanu ar UV/VIS spektrofotometrijas metodi.
2. Konstatēts, ka tehnoloģiski ir iespējams pagatavot skuju biezo ekstraktu saturošu pulverveida masu, kuru var pildīt cietajās želatīna kapsulās. Tomēr glabāšanas laikā novērotās izmaiņas liecina par kapsulās iepildītā ekstraktu saturoša pulverveida sastāva nestabilitāti.
3. Izstrādāta skuju biezo ekstraktu saturoša lipofila sastāva pildīšanai mīkstajās un cietajās želatīna kapsulās pagatavošanas tehnoloģija.
Noskaidrots, ka kapsulu pildījumā skuju biežā ekstrakta mitrumam un gaistošo vielu saturam jābūt ne lielākam par 10 %.
Atrastas piemērotās palīgvielas kapsulu pildījuma dispersās sistēmas iegūšanai – augu eļļa un emulgators (glicerīna monooleāts), kuras nodrošina stabilas dozētas formas pagatavošanu.

4. Izvērtējot dažādu iekapsulēšanas metožu pielietošanas iespējas skuju biežā ekstrakta dozētas formas pagatavošanai, noskaidrots, ka mīksto želatīna kapsulu nelielas eksperimentālās sērijas var pagatavot laboratorijas apstākļos ar iemērķšanas metodi. Skuju biezo ekstraktu saturošu lipofilu sastāvu var pildīt arī cietajās želatīna kapsulās. Rūpnieciskajā ražošanā mīksto želatīna kapsulu ar skuju biezo ekstraktu pagatavošanai jāizmanto rotējošo presformu metode. Skuju biezo ekstraktu saturošs lipofils sastāvs nav piemērots mīksto želatīna kapsulu iegūšanai ar pilināšanas metodi.
5. Izstrādātas mīksto želatīna kapsulu ar skuju biezo ekstraktu kvalitātes kontroles metodes. Karotīnu satura noteikšanas metodē modificēts paraugu sagatavošanas process karotīnu izdalīšanai ar kolonnas hromatogrāfijas palīdzību. Validējot karotīnu satura noteikšanas metodi mīkstajās želatīna kapsulās ar skuju biezo ekstraktu, konstatēts, ka metode ir specifiska, pietiekoši precīza un atkārtojama, lineārai sakarībai starp gaismas absorbciju un aktīvās vielas koncentrāciju šķīdumā nav gadījuma raksturs.
6. Pētot mīksto želatīna kapsulu ar skuju biezo ekstraktu stabilitāti, noskaidrots, ka laboratorijas sērijas kapsulas saglabāja kvalitāti ilgtermiņa stabilitātes pētījuma laikā 24 mēnešus un paātrinātās glabāšanas apstākļos 12 mēnešus. Noskaidrota iepakojuma veida un glabāšanas apstākļu ietekme uz mīksto želatīna kapsulu ar skuju biezo ekstraktu stabilitāti. Vērtējot pēc kapsulu ārējā izskata un sairšanas laika, konstatēts, ka mīksto želatīna kapsulu ar skuju biezo ekstraktu stabilitāte ir lielāka, uzglabājot augsta blīvuma polietilēna konteineros, salīdzinot ar alumīnija folijas un polivinilhlorīda plēves blisteriem. Tas īpaši attiecas uz glabāšanu stresa apstākļos paaugstinātā temperatūrā un mitrumā. Paredzams, ka mīksto želatīna kapsulu ar skuju biezo ekstraktu pilotsēriju un ražošanas sēriju kvalitāte saglabāsies 24 mēnešu laikā.

6. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS

1. Mīksto želatīna kapsulu ar skuju biezo ekstraktu sastāvā esošo karotinoīdu un hlorofilu identifikācijai var izmantot karotīnu kvantitatīvās noteikšanas metodi – kolonnas hromatogrāfiju ar sekojošu spektrofotometrisko karotīnu analīzi. Karotinoīdus un hlorofilus identificē pēc raksturīgās pozīcijas hromatogrāfijas kolonnā.
2. Karotīnu satura noteikšanai mīkstajās želatīna kapsulās ar skuju biezo ekstraktu var izmantot modificētu metodi ar vienkāršotu paraugu sagatavošanas procedūru, kas ļauj paātrināt un atvieglot analīzes gaitu, kā arī samazināt karotīnu zudumus.
3. Mīksto želatīna kapsulu ar skuju biezo ekstraktu sairšanas laika noteikšanai jāizmanto ūdens vide vai, ja sairšanas laiks pārsniedz pieļaujamo normu 30 min, fosfātu buferšķīdums ar pH 6,8 un pankreatīnu.
4. Mīksto želatīna kapsulu ar skuju biezo ekstraktu ražošanā jāizmanto izejviela ar karotīnu saturu ne mazāk par 35 mg %.
5. Ieteicamais mīksto želatīna kapsulu ar skuju biezo ekstraktu primārā iepakojuma veids ir augsta blīvuma polietilēna konteineri ar zema blīvuma polietilēna vākiem, vai alumīnija folijas un polivinilhlorīda plēves blisteri.
6. Mīksto želatīna kapsulu ar skuju biezo ekstraktu derīguma laiks ir 2 gadi. Uzglabāt temperatūrā līdz 25 °C, sargājot no mitruma un gaismas.

7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA UN INFORMĀCIJAS AVOTI

1. Beese K. The industrial utilisation of natural resources: how to quantify demand and compensation // *Phytochemical Diversity. A Source of New Industrial Products* / Ed. by Wrigley S., Hayes M., Thomas R., Chrystal E. – Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1997. – Pp. 129–140.
2. Sahoo N., Manchikanti P., Dey S. Herbal drugs: Standards and regulation // *Fitoterapia*, 2010; doi:10.1016/j.fitote.2010.02.001.
3. Rubine H., Eniņa V. Ārstniecības augi. – Apgāds Zvaigzne ABC, 2004. – 11.–27., 228.–231. lpp.
4. Korica A., Polis O., Daugavietis M. Metālu pāreja no augu izejvielām ekstraktos // *Mežzinātne*, 2008; 18 (51): 102–108.
5. Daugavietis M., Korica A., Polis O., Bartkevičs V. Skujkoku zaleņa piesārņojums ar pesticīdiem un smagajiem metāliem // *LLU Raksti*, 2008; 20 (315): 128–135.
6. Daugavietis M., Polis O., Korica A., Seļežņovs J. Priede – augstvērtīgu, bioloģiski aktīvu dabas vielu avots // *LLU Raksti*, 2002; 5: 59–67.
7. Павлуцкая И. С., Рощин В. И., Соловьев В. А. Групповой состав хлорофилло-каротиновой пасты и провитаминного концентрата из хвойной древесной зелени // *Химия древесины*, 1984; 6: 109–112.
8. Zaidi S. F. H., Yamada K., Kadowaki M., et al. Bactericidal activity of medicinal plants, employed for the treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori* // *Journal of Ethnopharmacology*, 2009; 121: 286–291.
9. Smith M. L. Functional dyspepsia pathogenesis and therapeutic options – Implications for management // *Digestive and Liver Disease*, 2005; 37: 547–558.
10. Stamatis G., Kyriazopoulos P., Golegou S., et al. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines // *Journal of Ethnopharmacology*, 2003; 88: 175–179.
11. Liu B. H., Lee Y. K. Effect of total secondary carotenoids extracts from *Chlorococcum* sp. on *Helicobacter pylori*-infected BALB/c mice // *International Immunopharmacology*, 2003; 3: 979–986.
12. Fukai T., Marumo A., Kaitou K., et al. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract // *Life Sciences*, 2002; 71: 1449–1463.
13. Quilez A., Berenguer B., Gilardoni G., et al. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpubya* Ruiz & Pav // *Journal of Ethnopharmacology*, 2010; 128: 583–589.
14. Germann I., Hagelauer D., Kelber O., et al. Antioxidative properties of the gastrointestinal phytopharmaceutical remedy STW 5 (Iberogast®) // *Phytomedicine*, 2006; 13 (SV): 45–50.
15. Koo M. W. L., Cho C. H. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system // *European Journal of Pharmacology*, 2004; 500: 177–185.
16. Rubens J., Seļežņovs J., Kleina R., Pokrotnieks J. Fitestēna klīniskā aprobācija // *Latvijas Ārsts*, 1995; 4: 16–19.
17. Rubens J., Kuzņecovs S., Daugavietis M., u.c. Līdzeklis ar reparatīvu iedarbību uz kuņģa čūlu un antibakteriālu iedarbību uz grampozitīvo floru un *Pseudomonas aeruginosa*. Patents LV 11276 B, 20.02.97.
18. Rubens J., Kuzņecovs S., Daugavietis M., Seļežņovs J. Fitestēna reparatīvo un baktericīdo īpašību izpēte // *Latvijas Ārsts*, 1990; 5: 41–44.

19. Селезнев Ю. В., Кузнецов С. Ю., Рубенс Ю. П., и др. Гастропротективное действие густого экстракта из хвои *Pinus sylvestris* L. и *Picea abies* (L.) Karst. // Растительные ресурсы, 2001; 37 (1): 63–69.
20. Rubens J., Seļežņovs J. Koksnes zaļās masas pārstrādes produktu antioksidanto īpašību izpēte // Latvijas Ārsts, 1995; 8: 35–37.
21. Рубенс Ю. П., Полуэктова Л. Е., Громова Н. Ф., Селезнев Ю. В. «Протефит» и «Фитестен» растительные иммуномодуляторы // Материалы международной конференции о природных веществах для здоровья и красоты. – Рига, 1997. – С. 92–93.
22. Seļežņovs J., Orļikovs G., Farbtuha T., u.c. Pēc radiācijas sindroma ārstēšanas rezultāti ar fitestēnu // AML/RSU Zinātniskie raksti. 2000. gada medicīnas nozares pētnieciskā darba publikācijas: Internā medicīna. Ķirurģija. Medicīnas bāzes zinātnes. Stomatoloģija. Farmācija. – Rīga: AML/RSU, 2001. – 53.–56. lpp.
23. York P. The design of dosage forms // *Pharmaceutics: The science of Dosage Form Design* / Ed. by Aulton M. E. – 2nd ed. – Edinburgh: Churchill & Livingston, 2002. – Pp. 1–12.
24. Hutchison K., Ferdinando J. Soft gelatin capsules // *Pharmaceutics: The science of Dosage Form Design* / Ed. by Aulton M. E. – 2nd ed. – Edinburgh: Churchill & Livingston, 2002. – Pp. 461–472.
25. Reich G. Formulation and physical properties of soft capsules // *Pharmaceutical Capsules* / Ed. by Podczek F., Jones B. E. – 2nd ed. – London: Pharmaceutical Press, 2004. – Pp. 201–212.
26. Meža nozare Latvijā 2009. LR Zemkopības ministrija // www.zm.gov.lv/doc_upl/Meza_nozare_Latvija_2009.pdf (sk. 28.07.2010.).
27. Meža platība. LR Zemkopības ministrija // www.zm.gov.lv/doc_upl/meza_platiba.pdf (sk. 28.07.2010.).
28. Latvijas valsts mežzinātnes institūts „Silava” 2008. gada publiskais pārskats. – Salaspils, 2009. – 38. – 39. lpp. // [www.silava.lv/userfiles/file/Publiskie%20parskati/Publiskais%20parskats%202008\(1\).pdf](http://www.silava.lv/userfiles/file/Publiskie%20parskati/Publiskais%20parskats%202008(1).pdf) (sk. 28.07.2010.).
29. Jansons J., Actiņš A., Gaitnieks T. Latvijas Valsts mežzinātnes institūta „Silava” zinātniskā darbība un stratēģiskā attīstība // LLU Raksti, 2009; 23 (318): 3–13.
30. Zarins I., Daugavietis M., Halimona J. Biological activity of plant extracts and their application as ecologically harmless biopesticide // *Scientific works of the Lithuanian institute of horticulture and Lithuanian university of agriculture. Sodninkystė ir daržininkystė*, 2009; 28(3): 269–280.
31. AS Biolat produkti (2010) // www.biolat.lv/main/produkti.aspx (sk. 24.02.2010.).
32. Harvesting and utilization of tree foliage. IUFRO Project group P3.05-00 meeting. – Riga, 1989. – 280 lpp.
33. Malykhin E. V., Vaganova T. A., Kukina T. P., et al. Tree green of Siberian abies as a raw material to manufacture biologically active substances // *Chemistry for Sustainable Development*, 2007; 15: 287–303.
34. Zhaobang S. Production and Standards for Chemical Non-Wood Forest Products in China. CIFOR (Center for International Forestry Research) Occasional Paper No. 6: Chemical NWFPs in China, 1995. – 18. Pp.
35. Solagran – Technology overview (2010) // www.solagran.com/index.php?com=site&menu_id=62 (sk. 24.02.2010.).
36. Рунова Е. М., Угрюмов Б. И. Комплексная переработка зелени хвойных пород с целью получения биологически активных веществ // *Химия растительного сырья*, 1998; 1: 57–60.

37. Журавлева Л. Н., Девятловская А. Н., Рубчевская Л.П. Древесная зелень сосны обыкновенной – перспективный источник биологически активных веществ // Вестник Красноярского ГАУ, 2008; 3: 166–169.
38. Neimane U., Veinberga I., Ruņģis D. Parastās priedes populāciju ģeogrāfisko atšķirību fenotipiskās un ģenētiskās īpašības Latvijas teritorijā // Mežzinātne, 2009; 20 (53): 3–15.
39. Apšegaitė V., Būda V. Polymorphism of Lithuanian Scots pine (*Pinus sylvestris*) with regard to monoterpene composition in needles // Ekologija, 2008; 54 (1): 17–21.
40. Чекушкина Н. В., Невзорова Т. В., Ефремов А. А. Фракционный состав эфирного масла сосны обыкновенной // Химия растительного сырья, 2008; 2: 87–90.
41. Gornostayeva L. I., Repyakh S. M. Volatile oils of coniferous plants of the *Pinaceae* family // Harvesting and utilization of tree foliage. IUFRO Project group P3.05-00 meeting. – Riga, 1989. Pp. 51–59.
42. Софронова В. Е., Чепалов В. А. Адаптивные изменения состава фотосинтетических пигментов хвои (*Pinus silvestris* L.) при понижении температуры // Наука и образование, 2007; 2: 34–39.
43. Matysiak R. Content of carotenoids in needles of *Pinus sylvestris* L. growing in a polluted area // Dendrobiology, 2001; 46: 39–42.
44. Lavola A., Aphalo P. J., Lahti M., Julkunen-Tiitto R. Nutrient availability and the effect of increasing UV-B radiation on secondary plant compounds in Scots pine // Environmental and Experimental Botany, 2003; 49: 49–60.
45. Экспериментальная витаминология: справочное руководство / Под ред. Ю. М. Островского. – Минск: Наука и техника, 1979. – С. 18–32, 58–65, 80, 133–135, 165–166.
46. Sudachkova N. E., Milyutina I. L., Romanova L. I. Free amino acid composition in Scots pine tissues under stress impact in rhizosphere // Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 2007; 3 (2): 4–14.
47. Девятловская А. Н., Журавлева Л. Н., Рубчевская Л. П., Девятловский Д. Н. Стерины в анатомических частях древесной зелени сосны обыкновенной // Вестник Красноярского ГАУ, 2009; 1: 75–79.
48. У Юй. Фенольные соединения кроны дерева сосны обыкновенной (*Pinus silvestris* L.): автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. хим. наук :05.21.03 / У Юй. – СПб., 2006. – 20 с.
49. Рошин В. И., Нагибина Н. Ю., Курц Л. Содержание основных соединений в хвое *Pinus silvestris* из разных мест произрастания // Химия природных соединений, 1990; 2: 276–277.
50. Кафедра технологии лесохимических производств и биологически активных веществ // ftacademy.ru/academy/faculties/htf/cafedra/bav/ (sk. 19.01.2010.).
51. Polis O., Korica A., Daugavietis M. Bioloģiski aktīvo savienojumu saglabāšanās egles zaleņa uzglabāšanas procesā // Mežzinātne, 2009; 19 (52): 82–90.
52. Daugavietis M., Polis O., Korica A. Egles vainaga biomasas izmantošanas iespējas // LLU Raksti, 2005; 14 (309): 72–75.
53. Анашенков С. Ю., Рошин В. И., Чернышова О. А. Водно-щелочная экстракция древесной зелени. 1. Влияние конструктивных особенностей экстрактора роторно-пульсационного типа и гидромодуля на выход экстрактивных веществ // Химия растительного сырья, 2008; 3: 65–70.
54. Анашенков С. Ю., Рошин В. И. Водно-щелочная экстракция древесной зелени. 2. Влияние концентрации щелочи и времени экстракции в роторно-пульсационном аппарате на выход экстрактивных веществ // Химия растительного сырья, 2008; 4: 105–108.

55. Рубчевская Л. П., Ушанова В. М., Журавлева Л. Н. Биологически активные вещества углекислотных и пропан-бутановых экстрактов древесной зелени // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева), 2004; XLVIII (3): 80–83.
56. Антонов В. И., Ягодин В. И. Превращения зеленых пигментов при экстракционной переработке древесной зелени хвойных // Химия растительного сырья, 2006; 1: 41–44.
57. Карманова Л. П., Кучин А. В., Кучин В. А. Химическая переработка древесной зелени пихты – основа технологий получения биологически активных веществ (обзорная статья) // Химия и химическая технология. Научно-технический журнал. Известия высших учебных заведений. Издание Ивановского государственного химико-технологического университета. Иваново, 2005; 48 (2): 3–11.
58. Шанина Е. В., Репях С. М. Выделение экстрактивных веществ водно-этанольными растворами из древесной зелени *Pinus silvestris* // Химия растительного сырья, 2003; 1: 61–63.
59. Skuju biezais ekstrakts // www.biolat.lv/21/section.aspx/38 (sk. 19.01.2010.).
60. Pavlutskaya I. S., Rostchin V. I. Composition of chlorophyll-carotene paste from Scots pine foliar fraction // Harvesting and utilization of tree foliage. IUFRO Project group P3.05-00 meeting. – Riga, 1989. Pp. 155–165.
61. Bespalov V. G. Clinical use of conifer green needle complex: A review of medical applications. – St. Petersburg, 2006. – 27 Pp. // www.ultimatepurity.se/bio_a_book_final.pdf (sk. 22.01.2010.).
62. Rodriguez-Bernaldo de Quirors A., Costa H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review // Journal of Food Composition and Analysis, 2006; 19: 97–111.
63. Rao A. V., Rao L. G. Carotenoids and human health // Pharmacological Research, 2007; 55: 207–216.
64. Tapiero H., Townsend D. M., Tew K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies // Biomedicine & Pharmacotherapy, 2004; 58: 100–110.
65. Su Q., Rowley K. G., Balazs N. D. H. Carotenoids: separation methods applicable to biological samples // Journal of Chromatography B, 2002; 781: 393–418.
66. Дадали В. А., Тутельян В. А., Дадали Ю. В., Кравченко Л. В. Каротиноиды. Биодоступность, биотрансформация, антиоксидантные свойства // Вопросы питания, 2010; 79 (2): 4–18.
67. IARC Handbooks of cancer prevention, volume 2: Carotenoids. – International Agency for Research on Cancer WHO, 1998. – Pp. 15, 34.
68. Taylor R. F., Little A. D. Chromatography of carotenoids and retinoids // Advances in Chromatography / Ed. by Giddings J. C., Grushka E., Cazes J., Brown P. R. – Vol. 22. – Marcel Dekker, Inc., 1983. – Pp. 157–206.
69. Goodwin T. W. Biosynthesis of Carotenoids and Plant Triterpenes. The fifth CIBA Medal Lecture // Biochemical Journal, 1971; 123: 293–329.
70. Rodriguez-Amaya D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. – Washington: ILSI Press, 2001. – Pp. 14–33, 41–45, 51–57.
71. Delgado-Vargas F., Paredes-Lopez O. Natural colorants for food and nutraceutical uses. – CRC Press LLC, 2003. DOI: 10.1201/9781420031713.ch7. – Pp 54.
72. Шашкина М. Я., Шашкин П. Н., Сергеев А. В. Каротиноиды как основа для создания лечебно-профилактических средств // Российский Биотерапевтический Журнал, 2009; 4 (8): 91–98.

73. Krinsky N. I., Johnson E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease // *Molecular Aspects of Medicine*, 2005; 26: 459–516.
74. Melendez-Martinez A. J., Britton G., Vicario I. M., Heredia F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments // *Food Chemistry*, 2007; 101: 1145–1150.
75. During A., Harrison E. H. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture // *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004; 430: 77–88.
76. Stahl W., van den Berg H., Arthur J., et al. Bioavailability and metabolism. Chapter 2 // *Molecular Aspects of Medicine*, 2002; 23: 39–100.
77. Beta carotene: Risk assessment. – Expert Group on Vitamins and Minerals, 2003. – Pp. 127–135.
78. During A., Harrison E. H. An in vitro model to study the intestinal absorption of carotenoids // *Food Research International*, 2005; 38: 1001–1008.
79. O'Sullivan S. M., Woods J. A., O'Brien N. M. Use of Tween 40 and Tween 80 to deliver a mixture of phytochemicals to human colonic adenocarcinoma cell (CaCo-2) monolayers // *British Journal of Nutrition*, 2004; 91: 757–764.
80. Collins A. R. Carotenoids and genomic stability // *Mutation Research*, 2001; 475: 21–28.
81. McNulty H. P., Byun J., Lockwood S. F., et al. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis // *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007; 1768: 167–174.
82. Schoefs B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis // *Trends in Food Science & Technology*, 2002; 13: 361–371.
83. Ferruzzi M. G., Blakeslee J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives // *Nutrition Research*, 2007; 27: 1–12.
84. Garrido J. L., Rodriguez F., Campan E., Zapata M. Rapid separation of chlorophylls a and b and their demetallated and dephytylated derivatives using a monolithic silica C18 column and a pyridine-containing mobile phase // *Journal of Chromatography A*, 2003; 994: 85–92.
85. Ferruzzi M. G., Failla M. L., Schwartz S. J. Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an in vitro digestion and Caco-2 human cell model // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001; 49 (4): 2082–2089.
86. Egner P. A., Stansbury K. H., Snyder E. P., et al. Identification and characterization of chlorin e(4) ethyl ester in sera of individuals participating in the chlorophyllin chemoprevention trial // *Chemical Research in Toxicology*, 2000; 13 (9): 900–906.
87. Egner P. A., Wang J. B., Zhu Y. R., et al. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin–DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer // *PNAS*, 2001; 98 (25): 14601–14606.
88. Egner P. A., Munoz A., Kensler T. W. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin // *Mutation Research*, 2003; 523–524: 209–216.
89. Ferruzzi M. G., Böhm V., Courtney P. D., Schwartz S. J. Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays // *Journal of Food Science*, 2002; 67 (7): 2589–2595.
90. Breinholt V., Hendricks J., Pereira C., et al. Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B, hepatocarcinogenesis in rainbow trout // *Cancer Research*, 1995; 55 (1): 57–62.

91. Simonich M. T., Egner P. A., Roebuck B. D., et al. Natural chlorophyll inhibits aflatoxin B1-induced multi-organ carcinogenesis in the rat // *Carcinogenesis*, 2007; 28 (6): 1294–1302.
92. Kumar S. S., Devasagayam T. P., Bhushan B., Verma N. C. Scavenging of reactive oxygen species by chlorophyllin: an ESR study // *Free Radical Research*, 2001; 35 (5): 563–574.
93. Kamat J. P., Boloor K. K., Devasagayam T. P. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo // *Biocimica et Biophysica Acta*, 2000; 1487 (27): 113–127.
94. Kumar S. S., Shankar B., Sainis K. B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes in vitro and in vivo // *Biocimica et Biophysica Acta*, 2004; 1672 (2): 100–11.
95. Park K. K., Park J. H., Jung Y. J., Chung W. Y. Inhibitory effects of chlorophyllin, hemin and tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin on oxidative DNA damage and mouse skin inflammation induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate as a possible anti-tumor promoting mechanism // *Mutation Research*, 2003; 542 (1–2): 89–97.
96. Dashwood R., Yamane S., Larsen R. Study of the forces of stabilizing complexes between chlorophylls and heterocyclic amine mutagens // *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1996; 27(3): 211–218.
279. Orner G. A., Roebuck B. D., Dashwood R. H., Bailey G. S. Post-initiation chlorophyllin exposure does not modulate aflatoxin-induced foci in the liver and colon of rats // *Journal of Carcinogenesis*, 2006, 5:6 doi:10.1186/1477-3163-5-6 <http://www.carcinogenesis.com/content/5/1/6> (sk. 21.06.2010.).
97. Tachino N., Guo D., Dashwood W. M., et al. Mechanisms of the in vitro antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen // *Mutation Research*, 1994; 308 (2): 191–203.
98. Breinholt V., Schimerlik M., Dashwood R., Bailey G. Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B1: complex formation with the carcinogen // *Chemical Research in Toxicology*, 1995; 8 (4): 506–514.
99. Fahey J. W., Stephenson K. K., Dinkova-Kostova A. T., et al. Chlorophyll, chlorophyllin and related tetrapyrroles are significant inducers of mammalian phase 2 cytoprotective genes // *Carcinogenesis*, 2005; 26 (7): 1247–1255.
100. Sen C. K., Khanna S., Roy S. Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family // *Molecular Aspects of Medicine*, 2007; 28 (5–6): 692–728.
101. Brigelius-Flohé R., Kelly F. J., Salonen J. T., et al. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research // *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002; 76: 703–716.
102. Dutta A., Dutta S. K. Vitamin E and its role in the prevention of atherosclerosis and carcinogenesis // *A Review Journal of the American College of Nutrition*, 2003; 22 (4): 258–268.
103. Lamson D. W., Plaza S. M. The anticancer effects of vitamin K // *Alternative Medicine Review*, 2003; 8: 303–318.
104. Erkkila A. T., Booth S. L., Hu F. B. et al. Phylloquinone intake as a marker for coronary heart disease risk but not stroke in women // *European Journal of Clinical Nutrition*, 2005; 59: 196–204.
105. Erkkila A. T., Booth S. L., Hu F. B. et al. Phylloquinone intake and risk of cardiovascular diseases in men // *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 2007; 17 (1): 58–62.
106. Awad A. B., Fink C. S. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action // *Journal of Nutrition*, 2000; 130: 2127–2130.

107. Kritchevsky D., Chen S. C. Phytosterols – health benefits and potential concerns: a review // Nutrition Research, 2005; 25: 413–428.
108. De Jong A., Plat J., Mensink R. P. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review) // The Journal of Nutritional Biochemistry, 2003; 14: 362–369.
109. Li J. H., Awad A. B., Fink C. S. et al. Measurement variability of plasma betasitosterol and campesterol, two new biomarkers for cancer prevention // European Journal of Cancer Prevention, 2001; 10: 245–249.
110. Gylling H., Miettinen T. A. The effect of plant stanol- and sterol-enriched foods on lipid metabolism, serum lipids and coronary heart disease // Annals of Clinical Biochemistry, 2005; 42 (4): 254–263.
111. De Stefani E., Boffetta P., Ronco A. L. et al. Plant sterols and risk of stomach cancer: a case-control study in Uruguay // Nutrition and Cancer, 2000; 37: 140–144.
112. Mendilaharsu M., De Stefani E., Deneo-Pellegrini H. et al. Phytosterols and risk of lung cancer: a case-control study in Uruguay // Lung Cancer, 1998; 21: 37–45.
113. Kazimierczak B., Hertel J., Swiezewska E. et al. On the specific pattern of long chain polyprenols in green needles of *Pinus mugo* Turra // Acta Biochimica Polonica, 1997; 44: 803–808.
114. Swiezewska E., Sasak W., Mankowski T., et al. The search for plant polyprenols // Acta Biochimica Polonica, 1994; 41 (3): 221–260.
115. Рошин В. И., Фрагина А. И., Соловьев В. А. Полипrenoлы и токоферолы из хвои *Picea abies* (L.) Karst. // Растительные ресурсы, 1986; 22 (4): 530–537.
116. Chojnacki T., Dallner G. The biological role of dolichol // Biochemical Journal, 1988; 251: 1–9.
117. Григорьева Н. Я., Моисеенков А. М. Физиологическая активность полиизопреноидов (обзор патентных данных) // Химико-фармацевтический журнал, 1989; 2: 144–155.
118. Bergamini E., Bizzarri R., Cavallini G. et al. Ageing and oxidative stress: a role for dolichol in the antioxidant machinery of cell membranes? // Journal of Alzheimer's Disease, 2004; 6: 129–135.
119. Eggens I., Elmberger P. G. Studies on the polyisoprenoid composition in hepatocellular carcinomas and its correlation with their differentiation // Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 1990; 98: 535–542.
120. Rubens J., Poluektova L., Gromova N., Seleznovs J. Immunomodulating active substance. US Patent 573157, 24.03.1998.
121. Kelly G. S. Squalene and its potential clinical uses // Alternative Medicine Review, 1999; 4: 29–36.
122. Smith T. J. Squalene: potential chemopreventive agent // Expert Opinion on Investigational Drugs, 2000; 9: 1841–1848.
123. Motiejūnaitė O., Pečiulytė D. Fungicidal properties of *Pinus sylvestris* L. for improvement of air quality // Medicina (Kaunas), 2004; 40 (8): 787–794.
124. Pugh J. Kinetics and product stability // Pharmaceuticals: The science of Dosage Form Design / Ed. by Aulton M. E. – 2nd ed. – Edinburgh: Churchill & Livingston, 2002. – Pp. 109–112.
125. Wells J. Pharmaceutical preformulation: the physicochemical properties of drug substances // Pharmaceuticals: The science of Dosage Form Design / Ed. by Aulton M. E. – 2nd ed. – Edinburgh: Churchill & Livingston, 2002. – Pp. 127–132, 136–138.
126. Jones B. E. The history of the medicinal capsule // Pharmaceutical Capsules / Ed. by Podczec F., Jones B. E. – 2nd ed. – London: Pharmaceutical Press, 2004. – Pp. 1–22.

127. Jones B. Hard gelatin capsules // *Pharmaceutics: The science of Dosage Form Design* / Ed. by Aulton M. E. – 2nd ed. – Edinburgh: Churchill & Livingston, 2002. – Pp. 449–460.
128. European Pharmacopoeia. – 6th ed. Volume 1, 2. – Strasbourg: Council of Europe, 2007. – Pp. 5, 24–25, 41–45, 53–54, 72–77, 107, 112–115, 256, 263–265, 278, 286–287, 327–330, 558–567, 682–685, 1290–1291, 2709–2712, 2938–2940.
129. Scherer R. P. Method of and machine for making capsules. US Patent No. 1970396, 14.08.1934.
130. Scherer R. P. Method and apparatus for making capsules by submerged filling action. U. S. Patent 2,152,101, Mar. 28, 1939.
131. Scherer R. P. Apparatus for forming and filling capsules. US Patent No. 2288327, 30.06.1942.
132. Rakucewich, J. An Alternative to Contract Manufacturing // *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1988; 14: 391–412.
133. Van Erven E. C., Jansen J. C. Process and apparatus for the manufacture of seamless filled capsules. US Patent No. 2911672, 10.11.1959.
134. Colton A. Capsule machine. US Patent No. 1787777, 06.01.1931.
135. Orelli J., Leuenberger H. Search for technological reasons to develop a capsule or a tablet formulation with respect to wettability and dissolution // *International Journal of Pharmaceutics*, 2004; 287: 135–145.
136. Tabibi S. E., Gupta S. L. Soft gelatin capsules development // *Insoluble Drug Formulation* / Ed. by Water R. L. – 2nd ed. – CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008. Pp. 590–607.
137. Newton J. M. Drug release from capsules // *Pharmaceutical Capsules* / Ed. by Podczek F., Jones B. E. – 2nd ed. – London: Pharmaceutical Press, 2004. – Pp. 213–237.
138. Podczek F. Technology to manufacture soft capsules // *Pharmaceutical Capsules* / Ed. by Podczek F., Jones B. E. – 2nd ed. – London: Pharmaceutical Press, 2004. – Pp. 195–199.
139. Jones D. *Pharmaceutics – Dosage Form and Design*. – London – Chicago: Pharmaceutical Press, 2008. – Pp. 255–270.
140. Bussemer T., Bodmeier R. Formulation parameters affecting the performance of coated gelatin capsules with pulsatile release profiles // *International Journal of Pharmaceutics*, 2003; 267: 59–68.
141. Stegemann S. Hard gelatin capsules today – and tomorrow // *Capsugel Bornem*. – 2nd ed. – Capsugel library, 2002. – Pp. 1–23.
142. Dugand J. P. M. Multicolor gelatin ribbons and manufacture of soft gelatin products. US Patent No. 6797201 B2, 28.09.2004.
143. Podczek F. Powder, granule and pellet properties for filling of two-piece hard capsules // *Pharmaceutical Capsules* / Ed. by Podczek F., Jones B. E. – 2nd ed. – London: Pharmaceutical Press, 2004. – Pp. 101–116.
144. Ciper M., Bodmeier R. Preparation and characterization of novel fast disintegrating capsules (Fastcaps) for administration in the oral cavity // *International Journal of Pharmaceutics*; 2005; 303: 62–71.
145. Jones R. T. Gelatin: manufacture and physic-chemical properties // *Pharmaceutical Capsules* / Ed. by Podczek F., Jones B. E. – 2nd ed. – London: Pharmaceutical Press, 2004. – Pp. 23–60.
146. Чжен Ф. Х., Николаенко Н. С., Трегубова Н. И., и др. Составы и технологии приготовления желатиновой массы для мягких капсул // *Химико-фармацевтический журнал*, 1985, 3: 233–236.

147. Jones B. E. Gelatin alternatives and additives // *Pharmaceutical Capsules* / Ed. by Podczek F., Jones B. E. – 2nd ed. – London: Pharmaceutical Press, 2004. – Pp. 61–77.
148. Cole G. C. Evaluating development and production costs: tablets versus capsules // *Pharmaceutical Technology Europe*, 1998; 5: 17–26.
149. Jones B. E. The filling of powders into two-piece hard capsules // *International Journal of Pharmaceutics*, 2001; 227: 5–26.
150. Jones B. E. Manufacture and properties of two-piece hard capsules // *Pharmaceutical Capsules* / Ed. by Podczek F., Jones B. E. – 2nd ed. – London: Pharmaceutical Press, 2004. – Pp. 79–98.
151. Gennadios A. Soft Gelatin Capsules // *Protein-Based Films and Coatings* / Ed. by Gennadios A. – CRC Press, 2002. – Pp. 393–443.
152. Karim A. A., Bhat R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins // *Food Hydrocolloids*, 2009; 23: 563–576.
153. Gomez-Estaca J., Montero P., Fernandez-Martin F., Gomez-Guillen M. C. Physico-chemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: A comparative study // *Journal of Food Engineering*, 2009; 90: 480–486.
154. Jongjareonraka A., Benjakula S., Visessanguanb W., Tanaka M. Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: Chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties // *Food Hydrocolloids*, 2006; 20: 1216–1222.
155. Kua M. S., Li W., Dulina W., et al. Performance qualification of a new hypromellose capsule: Part I. Comparative evaluation of physical, mechanical and processability quality attributes of Vcaps Plus[®], Quali-V[®] and gelatin capsules // *International Journal of Pharmaceutics*, 2010; 386: 30–41.
156. Sakata Y., Otsuka M. Evaluation of relationship between molecular behavior and mechanical strength of pullulan films // *International Journal of Pharmaceutics*, 2009; 374: 33–38.
157. Bae H. J., Cha D. S., Whiteside W. S., Park H. J. Film and pharmaceutical hard capsule properties of mungbean, waterchestnut, and sweet potato starches // *Food Chemistry*, 2008; 106: 96–105.
158. Sano Y., Itoh M., Nakajima Y., Enomoto I. Soft gelatin capsule. US Patent No. 6280767 B1, 28.08.2001.
159. Brox W., Meinzer A., Zande H. Soft gelatin capsule manufacture. US Patent No. 5985321, 16.11.1999; No. 6555132 B1, 29.04.2003; No. 6589536 B1, 08.07.2003; No. 7078054 B2, 18.07.2006.
160. Hom F. S., Veresh S. A., Ebert W. R. Soft Gelatin Capsules II: Oxygen Permeability Study of Capsule Shells // *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1975; 64: 851–857.
161. Matibag G. C., Igarashi M., Tamashiro H. BSE safety standards: An evaluation of public health policies of Japan, Europe, and USA // *Environmental Health and Preventive Medicine*, 2005; 10 (5): 303–314.
162. McKintosh E., Tabrizi S. J., Collinge J. Prion diseases // *Journal of NeuroVirology*, 2003; 9: 183–193.
163. Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products (EMEA/410/01 Rev. 2 — October 2003) adopted by the Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) and by the Committee for Veterinary Medicinal products (CVMP) // *Official Journal of the European Union*, C 024, 28/01/2004; Pp. 0006–0019.
164. Scherer R. P. Fabricating of filled sealed capsule. US Patent No. 2332671, 26.10.1943.
165. Wunderlich J. C., Schick U., Freidenreich J., Werry J. Soft gelatin capsules. US Patent No. 5254294, 19.10.1993.

166. Glenn B. H., Kiefer J. J. Method for making seamless capsules. International patent WO 96/11053, 18.04.1996.
167. Suzuki T., Ikeda M., Sugiyama M. Seamless capsule and method of manufacturing the same. US Patent No. 5882680, 16.03.1999; EP 0778083B1, 28.05.2003.
168. Suzuki T., Ikeda M., Okuda T. Method of producing seamless capsule. US patent No. 5478508, 26.12.1995.
169. Suzuki T., Matsumura F., Maeda H., et al. Method for producing seamless material-filled capsule and miniature capsule. US Patent No. 4426337, 17.01.1984.
170. Suzuki K., Ikeda M. Manufacturing method for oral quick-dissolving seamless capsule. US Patent No. 7025911 B2, 11.04.2006.
171. Morishita T., Sunohara H., Sono S. Method and apparatus for encapsulation of a liquid or meltable solid material. US Patent No. 4422985, 27.12.1983.
172. Kikuchi Y., Kamaguchi R. Seamless capsule and process for producing the same. US Patent No. 5330835, 19.07.1994.
173. Rowley G. Filling of liquids and semi-solids into hard two-piece capsules // *Pharmaceutical Capsules* / Ed. by Podczek F., Jones B. E. – 2nd ed. – London: Pharmaceutical Press, 2004. – Pp. 169–194.
174. Cole E. T., Cade D., Benameur H. Challenges and opportunities in the encapsulation of liquid and semi-solid formulations into capsules for oral administration // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008; 60: 747–756.
175. Staniforth J. Powder flow // *Pharmaceutics: The science of Dosage Form Design* / Ed. by Aulton M. E. – 2nd ed. – Edinburgh: Churchill & Livingston, 2002. – Pp. 197–210.
176. Brox W. Ethanol fill formulation for softgels etc. US Patent No. 4888239, 19.12.1989.
177. Gardella L. A., Kesler H. Gelatin-encapsulated digoxin solutions and method of preparing the same. US Patent No. 4002718, 11.01.1977.
178. Ghirardi P., Catenazzo G., Mantero O., et al. Bioavailability of digoxin in a new soluble pharmaceutical formulation in capsules // *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1977; 66: 267–269.
179. Dvorsky S., Radivojevic F., Joss H. Coronary therapeutic agent in the form of soft gelatin capsules. US Patent No. 4689233, 25.08.1987.
180. Brox W. Soft gelatin capsules and methods for their production. US Patent No. 4744988, 17.05.1988.
181. Gullapalli R. P. Ibuprofen-containing softgels. US Patent No. 6251426 B1, 26.06.2001.
182. Stegemann S., Leveiller F., Franchi D., et al. When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007; 31: 249–261.
183. Lacy J. E., Embleton J. K., Perry E. A. Delivery systems for hydrophobic drugs. US Patent No. 6096338, 01.08.2000.
184. Hauer B., Meinzer A., Posanski U., Richter F. Pharmaceutical compositions comprising cyclosporins. US Patent No. 5342625, 30.08.1994.
185. Rouffer M. T. Self-emulsifying ibuprofen solution and soft gelatin capsule for use therewith. US Patent No. 6221391 B1, 24.04.2001.

186. Hong C. I., Kim J. W., Choi N. H., et al. Cyclosporin-containing microemulsion preconcentrate composition. US Patent No. 6063762, 16.05.2000.
187. Kuentz M., Röthlisberger D. Determination of the optimal amount of water in liquid-fill masses for hard gelatin capsules by means of texture analysis and experimental design // *International Journal of Pharmaceutics*, 2002; 236: 145–152.
188. Marques M. R. C., Cole E., Kruep D., et al. Liquid-filled gelatin capsules // *Pharm Forum*. Stimuli to the revision process, 2009; 35 (4): 1029–1041.
189. Cole E.T. Liquid filled and sealed hard gelatin capsules. – *Bull. Tech. Gattefosse*, 1999. – Pp. 92, 67–77.
190. Serajuddin A. T. M., Sheen P.-C., Augustine M. A. Water migration from soft gelatin capsule shell to fill material and its effect on drug solubility // *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1986; 75 (1): 62–64.
191. Kattige A., Rowley G. Influence of rheological behaviour of particulate/polymer dispersions on liquid-filling characteristics for hard gelatin capsules // *International Journal of Pharmaceutics*, 2006; 316: 74–85.
192. Hauss D. J. Oral lipid-based formulations // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007; 59: 667–676.
193. Charman W. N. Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery – some emerging concepts // *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000; 89 (8): 967–978.
194. Jannin V., Musakhanian J., Marchaud D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008; 60: 734–746
195. Porter C. J. H., Charman W. N. In vitro assessment of oral lipid based formulations // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001; 50: S127–S147.
196. Aungst B.J. Intestinal permeation enhancers // *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000; 89: 429–442.
197. Porter C. J. H., Pouton C. W., Cuine J. F., Charman W. N. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008; 60: 673–691.
198. Porter C. J. H., Charman W. N. Intestinal lymphatic drug transport: an update // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001; 50 (1–2) 23: 61–80.
199. Porter C. J. H., Trevaskis N. L., Charman W. N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs // *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007; 6: 231–248.
200. Wright A. J., Pietrangelo C., MacNaughton A. Influence of simulated upper intestinal parameters on the efficiency of beta carotene micellarisation using an *in vitro* model of digestion // *Food Chemistry*, 2008; 107: 1253–1260.
201. Chakraborty S., Shukla D., Mishra B., Singh S. Lipid – An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009; 73: 1–15.
202. Attwood D. Disperse systems // *Pharmaceutics: The science of Dosage Form Design* / Ed. by Aulton M. E. – 2nd ed. – Edinburgh: Churchill & Livingston, 2002. – Pp. 70–100.
203. Myers D. Surfactant science and technology. – 3rd ed. – Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., 2006. – Pp. 15, 25, 26, 28, 69–73, 280–321.
204. Holmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. – 2nd ed. – John Wiley & Sons, Ltd., 2003. – Pp. 451–471.
205. Angelucci L., Petrangeli B., Celletti P., Flavilli S. Bioavailability of flufenamic acid in hard and soft gelatin capsules // *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1976; 65: 455–456.

206. Malmsten M. Surfactants and polymers in drug delivery. Drugs and the pharmaceutical science. Vol. 122. – New York – Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002. – Pp. 161–200.
207. Handbook of pharmaceutical excipients / Ed. by Kibbe A. H. – 3rd ed. Washington: American Pharmaceutical Association, London: Pharmaceutical Press, 2000. – Pp. 223–226, 416–419, 511–514.
208. Amar-Yuli I., Libster D., Aserin A., Garti N. Solubilization of food bioactives within lyotropic liquid crystalline mesophases // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2009; 14: 21–32.
209. Sagalowicz L., Leser M. E., Watzke H. J., Michel M. Monoglyceride selfassembly structures as delivery vehicles // *Trends in Food Science & Technology*, 2006; 17 (5): 204–214.
210. Strickley R. G. Currently marketed oral lipid-based dosage forms: drug products and excipients // *Oral Lipid-based Formulations: Enhancing the Bioavailability of Poorly Water-soluble Drugs* / Ed by Hauss D. J. – New York: Informa Healthcare, Inc., 2007. – Pp. 1–32.
211. Florence A. T., Attwood D. Physicochemical principles of pharmacy. – 4th ed. – Pharmaceutical Press, 2006. – Pp. 217–228, 237–253.
212. Shah J. C., Sadhale Y., Chilukuri D. M. Cubic phase gels as drug delivery systems // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001; 47: 229–250.
213. Spicer P. T. Progress in liquid crystalline dispersions: Cubosomes // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2005; 10: 274–279.
214. Kossena G. A., Charman W. N., Boyd B. J., Porter C. J. H. A novel cubic phase of medium chain lipid origin for the delivery of poorly water soluble drugs // *Journal of Controlled Release*, 2004; 99: 217–229.
215. Guideline on Stability Testing of New Active Substances and Products. CPMP/ICH/2736/99.
216. Guidance on Evaluation of Stability Date. CPMP/ICH/420/02.
217. Komka K., Kemeny S. A modified error model for the assessment of stability of pharmaceutical products // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2004; 72: 161–165.
218. Waterman K. C., Adami R. C. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals // *International Journal of Pharmaceutics*, 2005; 293: 101–125.
219. Chow S.-C., Shao J. Statistics in drug research: methodologies and recent developments. – New York: Marcel Dekker, Inc., 2002. – Pp. 77–106.
220. Chow S.-C. Statistical design and analysis of stability studies. – Chapman & Hall/CRC, Taylor & Francis Group, 2007. – Pp. 13–26.
221. ICH Q1A (R2) Guideline. Stability Testing of New Drug Substances and Products. Comments for its application. February 6, 2003.
222. Nicholson J. W. The chemistry of polymers. – 2nd ed. – Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1997 – Pp. 63–65.
223. Marchais H., Cayzele G., Legendre J.-Y., et al. Cross-linking of hard gelatin carbamazepine capsules: effect of dissolution conditions on in vitro drug release // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003; 19: 129–132.
224. Digenis G. A., Gold T. B., Shah V. P. Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro-in vivo performance // *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1994; 83(7): 915–921.

225. Singh S., Pakhale S. P. Gelatin-containing formulations: Changes in dissolution characteristics // Encyclopedia of pharmaceutical technology / Ed. by Swarbrick J. – 3rd ed. – New York: Marcel Dekker, Inc., 2007. – Pp. 1861–1874.
226. Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S., et al. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking // Biomaterials, 2001; 22: 763–768.
227. Strauss G., Gibson S. M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients // Food Hydrocolloids, 2004; 18: 81–89.
228. Brown J., Madit N., Cole E. T. et al. The effect of cross-linking on the in vivo disintegration of hard gelatin capsules // Pharmaceutical Research, 1998; 15(7): 1026–30.
229. Digenis G. A., Sandefer E. P., Page R. C., et al. Bioequivalence study of stressed and nonstressed hard gelatin capsules using amoxicillin as a drug marker and gamma scintigraphy to confirm time and GI location of in vivo capsule rupture // Pharmaceutical Research, 2000; 17 (5): 572–582.
230. Han J.-H., Abraham C., Gallery J. Pepsin and pancreatin performance in the dissolution of cross-linked gelatin capsules from pH 1 to 8 // www.aapsj.org/abstracts/AM_2004/AAPS2004-001341.PDF (sk. 16.06.2010.)
231. Gallery J., Han J. H., Abraham C. Pepsin and pancreatin performance in the dissolution of crosslinked gelatin capsules from pH 1 to 8 // Pharm Forum, 2004; 30(3): 1084–1089.
232. Yamamoto T., Kobayashi M., Matsuura S. Gelatin coating composition and hard gelatin capsule. US Patent No. 5419916, 30.05.1995.
233. Manual for soft capsule development // www.tokai-cap.co.jp/e_develop/techno.html (sk. 05.06.2010.).
234. Fitestēns. FP 95-0002/42-26-95. LR LM Farmakoloģijas un farmakopejas komiteja, 28.02.1995.
235. Skuju biezais ekstrakts. LV UTN 000312820-18-2008. A/S Biolat, 02.19.2008.
236. Hlorofila karotīna pasta. US 000312820-12-99, A/S Biolat, 27.12.2000.
237. Константинова И. Н., Артюх М. А., Кулькевича К. А. Применение физико-химических методов для оценки качества густого экстракта хвои // Фармация. Сборник научных статей. – Рига: РМИ, 1989. – С. 83–86.
238. Химический анализ лекарственных растений / Под ред. Гринкевич Н. И., Сафронич Л. Н. – Москва: Высшая школа, 1983. – С. 8–12.
239. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. Ч. 1, 2. – Москва: Мир, 1980. – С. 301–305.
240. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. Т. 1, 2. – Москва: Мир, 1981. – С. 266 (Т. 1), 257–266 (Т. 2).
241. Fruits, vegetables and derived products – Determination of carotene content – Part 2: Routine methods. International Standard. ISO 6558-2:1992(E). P. 1–3.
242. Масло облепиховое. ФС 42-1730-95.
243. Teibe U., Berķis U. Varbūtības teorijas un matemātiskās statistikas elementi medicīnas studentiem. – Rīga: LMA, 2001. – 19., 22., 52.–53. lpp.
244. Gardiner W. P. Statistical analysis methods for chemists. – Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1997. – Pp. 168–226.

245. http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorophyll#cite_ref-9 (skat. 10.06.10.).
246. Carotenoids: Handbook / Ed. by Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. – Basel-Boston-Berlin: Birkhäuser Verlag, 2004. – Pp. 660.
247. Ren D., Zhang S. Separation and identification of the yellow carotenoids in *Potamogeton crispus* L. // Food Chemistry, 2008; 106: 410–414.
248. Hynninen P. H., Ellfolk N. Chlorophylls I. Separation and isolation of chlorophylls *a* and *b* by multiple liquid-liquid partition // Acta Chemica Scandinavica, 1973; 27: 1463–1477.
249. Антонов В. И., Ягодин В. И. Спектральные характеристики препаратов хлорофилла из еловой древесной зелени // Химия растительного сырья, 2006; 2: 47–49.
250. Hynninen P. H., Wasielewski M. R., Katz J. J. Chlorophylls VI. Epimerization and enolization of chlorophyll *a* and its magnesium-free derivatives // Acta Chemica Scandinavica, 1979; 33: 637–648.
251. Руководство к лабораторным занятиям по заводской технологии лекарственных форм / Под ред. Тенцовой А. И. – Москва: Медицина, 1986. – С. 57–62.
252. Муравьев И. А. Технология лекарств. Том II. Москва. – Москва: Медицина, 1980. – С. 584–588.
253. Рошин В. И. Некоторые аспекты методологии исследования экстрактов из древесной зелени // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы III Всероссийской конференции. 23-27 апреля 2007 г. / под ред. Н. Г. Базарновой, В. И. Маркина. Барнаул: Изд-во Алтайского ун-та, 2007. – Кн. 2. – С. 136 – 140.
254. Рошин В. И. Химический состав липидной фракции хвои сосны и ели // Изучение и применение лечебно-профилактических препаратов на основе природных биологически активных веществ: Сб. науч. тр. / Под ред. Беспалова В. Г., Некрасовой В. Б. – Санкт-Петербург: Эскулап, 2000. – С. 114–116.
255. Чечета О.В., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. Методика определения каротиноидов методом хроматографии в тонком слое сорбента // Сорбционные и хроматографические процессы, 2008; 8 (2): 320–326.
256. Schoefs B. Determination of pigments in vegetables // Journal of Chromatography A, 2004; 1054: 217–226.
257. Melendez-Martinez A. J., Vicario I. M., Heredia F. J. Review: Analysis of carotenoids in orange juice // Journal of Food Composition and Analysis, 2007; 20: 638–649.
258. Федеральный реестр разрешенных БАД, Лесмин // <http://obad.ru/registrbad/lesmin-25263.html>, Феокарпин // <http://obad.ru/registrbad/feokarpin-62775.html>, Феокарпин форте // <http://obad.ru/registrbad/feokarpin-forte-13563.html> (skat. 14.07.2010.).
259. Overgaard A. B. A., Hojsted J., Hansen R., et al. Patient's evaluation of shape, size and colour of solid dosage forms // Pharmacy World & Science, 2001; 23(5): 185–188.
260. Stella V. J., Haslam J., Yata N., et al. Enhancement of bioavailability of a hydrophobic amine antimalarial by formulation with oleic acid in a soft gelatin capsule // Journal of Pharmaceutical Sciences, 1978; 67: 1375–1377.
261. Carrigan P. J., Bates T. R. Biopharmaceutics of drugs administered in lipid-containing dosage forms: GI absorption of griseofulvin from an oil in water emulsion in the rat // Journal of Pharmaceutical Sciences, 1973; 62: 1476–1479.
262. Bates T. R., Seiqueira J. A. Bioavailability of micronized griseofulvin from corn oil-in-water emulsion, aqueous suspension, and commercial tablet dosage forms in humans // Journal of Pharmaceutical Sciences, 1975; 64: 793–797.

263. Behrens D., Fricker R., Bodoky A., et al. Comparison of cyclosporin A absorption from LCT and MCT solutions following intrajejunal administration in conscious dogs // *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996; 85: 666–668.
264. Gibson L. Lipid-based excipients for oral drug delivery // *Oral Lipid-based Formulations: Enhancing the Bioavailability of Poorly Water-soluble Drugs* / Ed by Hauss D. J. – New York: Informa Healthcare, Inc., 2007. – Pp. 43–51.
265. Caliph S. M., Charman W. N., Porter C. J. H. Effect of short-, medium-, and long-chain fatty acid-based vehicles on the absolute oral bioavailability and intestinal lymphatic transport of halofantrine and assessment of mass balance in lymph-cannulated and non-cannulated rats // *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000; 89: 1073–1084.
266. Grove M., Pedersen G. P., Nielsen J. L., Mullertz A. Bioavailability of seocalcitol I: relating solubility in biorelevant media with oral bioavailability in rats-effect of medium and long chain triglycerides // *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005; 94: 1830–1838.
267. Mercke Odeberg J., Lignell A., Pettersson A., Höglund P. Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003; 19: 299–304.
268. Guideline on quality of herbal medicinal products / Traditional herbal medicinal products. CPMP/QWP/2819/00 rev 1. EMEA/CVMP/814/00 rev 1. 30 march 2006.
269. Guideline on quality of combination herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. EMEA/HMPC/CHMP/CVMP/214869/2006.
270. Yoshioka S., Stella V. J. Stability of drugs and dosage forms. – New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers. Pp. 157, 176, 205–215.
271. Dean D. A. Films, foils and laminations (combination materials) // *Pharmaceutical packaging technology* / Ed. by Dean D. A., Evans E. R., Hall I. H. – London, New York: Taylor & Francis, 2000. – Pp. 367–403.
272. Dean D. A. Blister, strip and sachet packaging // *Pharmaceutical packaging technology* / Ed. by Dean D. A., Evans E. R., Hall I. H. – London, New York: Taylor & Francis, 2000. – Pp. 517–546.
273. Pilchik R. Pharmaceutical blister packaging, part I. Rationale and materials // *Pharmaceutical Technology*, 2000; 11: 68–80.

PIELIKUMI

1. pielikums. Napolāros šķīdinātajos iegūto priedes zaleņa ekstraktvielu vidējais sastāvs [6]

	Vielu grupu un/vai vielu nosaukums	Saturs, % no sausnes
1.	Neitrālās vielas	45,43
1.1.	Ogļūdeņraži	1,5628
1.1.1.	Alkāni	0,1726
1.1.2.	Monoterpēni	0,2680
	t.sk. α - pinēns	0,0954
	γ -terpinēns	0,0772
1.1.3.	Seskviterpēni	0,4906
	t. sk. δ -kadinēns	0,0545
	α - murolēns	0,3089
1.1.4.	Diterpēni	0,3952
	t. sk. izopimaradiēns	0,0999
	dehidroabietadiēns	0,0727
1.1.5.	Triterpēni (skvalēns)	0,0636
1.2.	Ēsteri	14,9147
1.2.1.	Ēsteru sārmainās hidrolīzes produkti	5,8605
	t. sk. alifātiskie piesātinātie spirti	0,6860
	poliprenoli	2,7440
	geranilgeraniols	zīmes
	borneols	zīmes
	3 β - hidroksitransbiformens	zīmes
	cikloartenols	0,0999
	24-metilēncikloartanols	0,0591
	β -sitosterīns	0,9949
	kampesterīns	0,0454
	saistītās skābes	0,9858
1.2.2.	Pimārskābes un abietīnskābes tipa sveķskābju metilēsteri	1,1857
1.2.3.	Triacilglicerīni	6,2603
1.2.4.	Diacilglicerīni	1,6082
1.3.	Oksosavienojumi (aldehīdi)	0,7223
1.3.1.	Aldehīdi	0,7223
	t. sk. pimarīnāls	0,2181
	palustrāls un/vai levopimarīnāls	0,0136
	izopimarīnāls	0,1953
	abietāls	0,0681
	dehidroabietīnāls	0,2272
1.4.	Oksīdi	0,2953
1.4.1.	Oksīdi	0,2953
	t. sk. manoiloksīds	0,1908
	epimanoiloksīds	0,1045
1.4.2.	Seratēntipa triterpenoīdi	0,2090
	t. sk. 3- β -21 α -dimetoksiserat-14-ēns	0,0727

	Vielu grupu un/vai vielu nosaukums	Saturs, % no sausnes
	3-β-metoksiserat-14-ēn-21-ons	0,0454
	3,21-diketoserat-14-ēns	0,0909
1.5.	Spirti	12,8612
1.5.1.	Alifātiskie spirti	5,1282
1.5.1.1.	Piesātinātie spirti	3,3177
	t. sk. pirmējie	0,9449
	otrējie (nonakozanols-10)	2,3624
1.5.1.2.	Nepiesātinātie poliprenoli	1,0540
1.5.2.	Monoterpēns spirti (α-terpineols)	0,0727
1.5.3.	Seskviterpēns spirti	0,3589
	t. sk. τ-kadinols	0,2135
	δ-kadinols	0,1454
1.5.4.	Diterpēns spirti	6,8054
1.5.4.1.	Acikliskie	0,3680
	t. sk. geranilgeraniols	0,0545
	Fitols	0,3135
1.5.4.2.	Bicikliskie	4,8610
	t.sk. izoabienols	4,3795
	cis-abienols	0,2408
	16-hidroksimanoiloksīds	0,1181
	16-hidroksi-13-epimanoiloksīds	0,1227
1.5.4.3.	Tricikliskie	1,8172
	t.sk. pimarīnols	0,3498
	abietīnols	0,1681
	izopimarīnols	0,5315
	dehidroabietīnols	0,3998
	18-nordehidroabietīnols	0,2181
	18-norizopimarīnols	0,1499
1.5.5.	Triterpēns spirti	0,4906
	t.sk. cikloartenols	0,2453
	24-metilēncikloartanol	0,2453
1.6.	Sterīni	1,8535
	t.sk. β-sitosterīns	1,6718
	kampesterīns	0,0772
	5-holesterīns	0,0681
1.7.	Hlorofīlu atvasinājumi un vaskveida vielas	12,9476
	t.sk. hlorofīla atvasinājumi	< 0,7
2.	Brīvās skābes	53,57
2.1.	Augstākās taukskābes	14,6085
2.1.1.	Piesātinātās augstākās taukskābes	7,0659
	t. sk. arahīnskābe	1,4725
	palmitīnskābe	1,2534
	begēnskābe	1,1102
	laurīnskābe	0,4762

	Vielu grupu un/vai vielu nosaukums	Saturs, % no sausnes
	lignocerīnskābe	0,4310
	miristīnskābe	0,2425
	stearīnskābe	0,1972
	12-metiltetradekānskābe	0,1519
	13,13-dimetiltetradekānskābe	0,1008
	tridekānskābe	0,0073
	12-metil tridekānskābe	0,0044
2.1.2.	Nepiesātinātās augstākās taukskābes	8,0784
	t.sk. oleīnskābe	3,1218
	linolskābe	1,8684
	11-eikozēnskābe	1,0314
	8,11-eikozadiēnskābe	0,5507
	izolinolskābe	0,5449
	5,9,12-oktadekatriēnskābe	0,4967
	arahidonskābe	0,4426
	11,14-eikozadiēnskābe	0,3331
	8,11,14-eikozatriēnskābe	0,1242
	linolēnskābe	0,0614
	palmitīnskābe	0,0511
	7,10-heksadekadiēnskābe	0,0336
	4,7,10-heksadekatriēnskābe	0,0205
2.2.	Sveķskābes	10,1408
	t. sk. pimārskābe	1,2696
	palustr un/vai levopimārskābe	0,2196
	dehidroabietīnskābe	0,4178
	izopimārskābe	2,4053
	abietīnskābe	2,3249
	neoabietīnskābe	0,2893
2.3.	Polārās skābes	27,2939
	t.sk. pinifolskābes monometilēsteris	14,0353
	pinifolskābe	1,2268
	4-epiimbrikatālskābe	0,2196
	4-epiimbrikatolskābe	0,4553
	18-acetoksiantikopālskābe	0,1554
	18-hidroksiantikopālskābe	0,4178
	12-ketoabietīnskābe	0,1982
	12 α -hidroksiabietīnskābe	0,2250
	7-ketodehidroabietīnskābe	0,2304
	7 α -hidroksidehidroabietīnskābe	0,0964
	12 -hidroksidehidroabietīnskābe	0,2518
	15 -hidroksidehidroabietīnskābe	0,5196

2. pielikums. SBE kvalitātes rādītāji [234, 235]

Rādītāja nosaukums	Raksturojums, prasības un normas	
	Farmakopejas priekšraksts FP 95-0002/42-26-95 „Fitestens” (SBE ₁)	LV UTN 000312820-18-2008 „Skuju biežais ekstrakts” (SBE ₂)
Ārējais izskats	bieza masa	bieza masa
Krāsa	no olīvu zaļas līdz tumši zaļai	no olīvu zaļas līdz tumši zaļai
Smarža	vāja, specifiska skuju	vāja, specifiska skuju
Garša	rūgta	rūgta
Identitāte: - hlorofils - karotinoīdi un nepiesātinātie ogļūdeņraži	atbilst atbilst	atbilst atbilst
Masas zudums žāvējot, %, ne vairāk par	40,0	10,0
Ūdeņraža eksponents (pH)	-	8,0 – 10,0
Karotīnu saturs sausā produktā, mg %, ne mazāk par	30,00	30,00
Kopējais aerobo baktēriju skaits Kopējais sēņu skaits <i>Escherichia coli</i> klātbūtne	ne vairāk par 10 ³ KVV/g ne vairāk par 10 ² KVV/g nav pieļaujama 1 g	ne vairāk par 10 ³ KVV/g ne vairāk par 10 ² KVV/g nav pieļaujama 1 g

3. pielikums. I varianta SBE₁ saturošu pulveru sastāvi

Sastāva Nr.	Vielas nosaukums un daudzums, daļas							Pulvera ārējais izskats un konsistence
	Skuju biežais ekstrakts (SBE ₁)	Laktoze	Lakricas sausais ekstrakts	Alumīnija hidroksīds	Magnija oksīds	Kalcija karbonāts	Bismuta subnitrāts	
1.	1	4	-	-	-	-	-	Mitrs pulveris
2.	1	6	-	-	-	-	-	Sauss pulveris
3.	1	6	1	-	-	-	-	Sauss pulveris
4.	1	-	3	-	-	-	-	Lipīga masa
5.	1	-	-	1	-	-	-	Bieza lipīga masa
6.	1	-	-	2	-	-	-	Lipīga masa
7.	1	-	-	2,5	-	-	-	Lipīga masa
8.	1	-	-	3	-	-	-	Lipīga masa
9.	1	-	-	3,5	-	-	-	Lipīga masa
10.	1	-	-	4	-	-	-	Lipīga masa
11.	1	-	-	0,5	0,5	-	-	Bieza lipīga masa
12.	1	-	-	0,75	0,75	-	-	Bieza lipīga masa
13.	1	-	-	1	1	-	-	Bieza lipīga masa
14.	1	-	-	-	1	-	-	Bieza lipīga masa
15.	1	-	-	-	1,5	-	-	Mitrs pulveris
16.	1	-	-	-	2	-	-	Sauss pulveris
17.	1	-	-	-	0,5	0,5	-	Bieza lipīga masa
18.	1	-	-	-	1	1	-	Blīva lipīga masa
19.	1	-	-	-	1,25	1,25	-	Mitrs pulveris
20.	1	-	-	-	1,5	1,5	-	Sauss pulveris
21.	1	-	-	-	-	1	-	Bieza lipīga masa
22.	1	-	-	-	-	2	-	Bieza lipīga masa
23.	1	-	-	-	-	3	-	Lipīga masa
24.	1	-	-	-	-	4	-	Ļoti mitrs pulveris
25.	1	-	-	-	-	5	-	Mitrs pulveris
26.	1	-	-	-	1,5	1,5	1	Sauss birstošs pulveris
27.	1	-	1	-	1	-	-	Bieza lipīga masa ar amonjaka smaržu

4. pielikums. SBE₂ MŽK laboratorijas sērijas stabilitāte

Produkts: **Skuju biezais ekstrakts 300 mg kapsulas**

Sērijas lielums: 450 kapsulu.

Izgatavošanas datums: 30.06.05.

Primārais iepakojums: augsta blīvuma polietilēna konteineri, tilpums 150 ml, ar zema blīvuma polietilēna vākiem.

Glabāšanas apstākļi: ilgtermiņa uzglabāšana (25 ± 2) °C

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	Rezultāti						
		Pirms glabāšanas	3 mēneši	6 mēneši	9 mēneši	12 mēneši	18 mēneši	24 mēneši
Apraksts	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar redzamu aizkausējuma vietu, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra $\lambda_{\max}$, nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Kapsulas satura vidējā masa, mg	1000,0	972,8	965,8	969,3	980,5	977,4	965,6	963,7
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, %	$\pm 7,5$ robežās	-6,25 ÷ +7,47	-7,07 ÷ +7,36	-5,07 ÷ +7,51	-5,88 ÷ +7,21	-7,43 ÷ +6,30	-6,68 ÷ +7,02	-5,97 ÷ +6,56
Sairšanas laiks, min	Ne vairāk par 30	8 – 10	8 – 11	9 – 11	9 – 12	10 – 12	13 – 16	15 – 18
Karotīnu saturs preparātā, mg %	Ne mazāk par 30	38,94±0,58	36,57±0,42	35,64±0,52	35,12±0,87	34,52±0,94	31,83±1,73	30,12±0,80
Karotīnu saturs kapsulā, µg	Ne mazāk par 80	104,1±1,6	97,8±1,1	95,3±1,4	93,9±2,4	92,3±2,5	85,1±4,7	80,5±2,2

4. pielikums (turpinājums).

Glabāšanas apstākļi: paātrinātā uzglabāšana (30 ± 2) °C

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	Rezultāti				
		Pirms glabāšanas	3 mēneši	6 mēneši	9 mēneši	12 mēneši
Apraksts	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar redzamu aizkausējuma vietu, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra $\lambda_{\max}$, nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Kapsulas satura vidējā masa, mg	1000,0	972,8	958,3	967,4	963,8	959,4
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, %	$\pm 7,5$ robežās	-6,25 ÷ +7,47	-7,32 ÷ +7,12	-6,78 ÷ +7,33	-6,43 ÷ +6,87	-6,65 ÷ +7,57
Sairšanas laiks, min	Ne vairāk par 30	8 – 10	9 – 12	12 – 15	14 – 17	20 – 24
Karotīnu saturs preparātā, mg %	Ne mazāk par 30	38,94±0,58	42,14±0,82	36,07±0,74	35,80±0,69	35,34±0,85
Karotīnu saturs kapsulā, µg	Ne mazāk par 80	104,1±1,6	112,7±2,2	96,5±2,0	95,7±1,8	94,5±2,3

5. pielikums. SBE₂ MŽK 1. pilotsērijas stabilitāte

Produkts: **Skuju biezais ekstrakts 300 mg kapsulas**

Pilotsērija **Nr. 1.** Sērijas lielums: 4000 kapsulu.

Izgatavošanas datums: 31.10.06.

Primārais iepakojums: bezkrāsainas, caurspīdīgas polivinilhlorīda plēves un alumīnija folijas blisteri.

Glabāšanas apstākļi: ilgtermiņa uzglabāšana (25 ± 2) °C

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	Rezultāti				
		Pirms glabāšanas	3 mēneši	6 mēneši	9 mēneši	12 mēneši
Apraksts	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar šuvi, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra $\lambda_{\max}$, nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Kapsulas satura vidējā masa, mg	600,0	608,7	606,3	605,5	-	603,8
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, %	$\pm 7,5$ robežās	$-4,03 \div +3,73$	$-4,20 \div +3,39$	$-3,78 \div +3,64$	-	$-3,83 \div +3,56$
Sairšanas laiks, min	Ne vairāk par 30	18 – 20	19 – 22	23 – 26	26 – 28	26 – 30
Karotīnu saturs preparātā, mg %	Ne mazāk par 30	22,03 $\pm$ 0,86	21,91 $\pm$ 0,29	19,48 $\pm$ 0,50	16,85 $\pm$ 0,34	16,22 $\pm$ 0,19
Karotīnu saturs kapsulā, μ g	Ne mazāk par 80	58,9 $\pm$ 2,3	58,6 $\pm$ 0,8	52,1 $\pm$ 1,4	45,0 $\pm$ 0,9	43,4 $\pm$ 0,5

5. pielikums (turpinājums).

Glabāšanas apstākļi: paātrinātā uzglabāšana (30 ± 2) °C

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	Rezultāti				
		Pirms glabāšanas	3 mēneši	6 mēneši	9 mēneši	12 mēneši
Apraksts	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar šuvi, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra $\lambda_{\max}$, nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Kapsulas satura vidējā masa, mg	600,0	608,7	605,8	604,6	-	603,9
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, %	$\pm 7,5$ robežās	$-4,03 \div +3,73$	$-4,12 \div +3,80$	$-3,92 \div +3,54$	-	$-4,15 \div +3,77$
Sairšanas laiks, min	Ne vairāk par 30	18 – 20	22 – 24	26 – 30	28 – 30	29 – 32
Karotīnu saturs preparātā, mg %	Ne mazāk par 30	22,03±0,86	23,45±0,46	20,73±0,24	19,88±1,56	11,33±0,23
Karotīnu saturs kapsulā, µg	Ne mazāk par 80	58,9±2,3	62,7±1,2	55,4±0,6	53,2±4,2	30,3±0,6

6. pielikums. SBE₂ MŽK 2. pilotsērijas stabilitāte

Produkts: **Skuju biezais ekstrakts 300 mg kapsulas**

Pilotsērija **Nr. 2.** Sērijas lielums: 15800 kapsulu.

Izgatavošanas datums: 22.10.09.

Primārais iepakojums: augsta blīvuma polietilēna konteineri, tilpums 150 ml, ar zema blīvuma polietilēna vākiem.

Glabāšanas apstākļi: ilgtermiņa uzglabāšana (25 ± 2) °C

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	Rezultāti			
		Pirms glabāšanas	3 mēneši	6 mēneši	9 mēneši
Apraksts	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar šuvi, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra $\lambda_{\max}$, nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Kapsulas satura vidējā masa, mg	600,0	599,7	598,6	596,5	595,9
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, %	$\pm 7,5$ robežās	-3,09 ÷ +2,39	-2,78 ÷ +2,55	-3,32 ÷ +2,22	-2,88 ÷ +2,45
Sairšanas laiks, min	Ne vairāk par 30	18 – 20	20 – 22	20 – 23	21 – 24
Karotīnu saturs preparātā, mg %	Ne mazāk par 30	41,89±1,13	42,77±1,38	43,43±1,16	43,39±1,39
Karotīnu saturs kapsulā, µg	Ne mazāk par 80	112,1±3,0	114,4±3,7	116,2±3,1	116,1±3,7

6. pielikums (turpinājums).

Glabāšanas apstākļi: paātrinātā uzglabāšana (30 ± 2) °C

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	Rezultāti			
		Pirms glabāšanas	3 mēneši	6 mēneši	9 mēneši
Apraksts	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar šuvi, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra $\lambda_{\max}$, nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Kapsulas satura vidējā masa, mg	600,0	599,7	596,4	593,8	593,4
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, %	$\pm 7,5$ robežās	-3,09 ÷ +2,39	-2,45 ÷ +2,36	-3,02 ÷ +2,87	-2,34 ÷ +2,56
Sairšanas laiks, min	Ne vairāk par 30	18 – 20	22 – 24	23 – 25	25 – 27
Karotīnu saturs preparātā, mg %	Ne mazāk par 30	41,89±1,13	42,64±1,73	43,58±1,36	43,80±2,63
Karotīnu saturs kapsulā, µg	Ne mazāk par 80	112,1±3,0	114,1±4,6	116,6±3,6	117,5±6,7

7. pielikums. SBE₂ MŽK 3. pilotsērijas stabilitāte

Produkts: **Skuju biežais ekstrakts 300 mg kapsulas**

Pilotsērija **Nr. 3**. Sērijas lielums: 15800 kapsulu.

Izgatavošanas datums: 23.10.09.

Primārais iepakojums: bezkrāsainas, caurspīdīgas polivinilhlorīda plēves un alumīnija folijas blisteri.

Glabāšanas apstākļi: ilgtermiņa uzglabāšana (25 ± 2) °C

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	Rezultāti			
		Pirms glabāšanas	3 mēneši	6 mēneši	9 mēneši
Apraksts	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar šuvi, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra $\lambda_{\max}$, nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Kapsulas satura vidējā masa, mg	600,0	580,9	585,3	582,4	580,2
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, %	$\pm 7,5$ robežās	-1,75 ÷ +1,19	-2,05 ÷ +1,84	-1,97 ÷ +1,32	-2,11 ÷ +1,67
Sairšanas laiks, min	Ne vairāk par 30	17 – 19	20 – 22	21 – 23	22 – 25
Karotīnu saturs preparātā, mg %	Ne mazāk par 30	36,36±0,43	35,59±0,43	35,46±0,84	35,45±0,68
Karotīnu saturs kapsulā, µg	Ne mazāk par 80	97,3±1,2	95,2±1,1	94,9±2,3	94,9±1,8

7. pielikums (turpinājums).

Glabāšanas apstākļi: paātrinātā uzglabāšana (30 ± 2) °C

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	Rezultāti			
		Pirms glabāšanas	3 mēneši	6 mēneši	9 mēneši
Apraksts	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar šuvi, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra $\lambda_{\max}$, nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Atbilst	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Kapsulas satura vidējā masa, mg	600,0	580,9	580,7	583,8	578,9
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, %	$\pm 7,5$ robežās	-1,75 ÷ +1,19	-1,86 ÷ +1,56	-1,88 ÷ +1,12	-2,13 ÷ +1,54
Sairšanas laiks, min	Ne vairāk par 30	17 – 19	21 – 23	23 – 26	26 – 28
Karotīnu saturs preparātā, mg %	Ne mazāk par 30	36,36±0,43	35,89±0,41	36,01±0,31	36,44±0,15
Karotīnu saturs kapsulā, µg	Ne mazāk par 80	97,3±1,2	96,0±1,1	96,3±0,9	97,5±0,4

8. pielikums. SBE₂ MŽK I ražošanas sērijas stabilitāte

Produkts: **Fitesten 300 mg kapsulas**

Ražošanas sērija Nr. 1011009. Sērijas lielums: 142500 kapsulu.

Izgatavošanas datums: 10.11.09.

Primārais iepakojums: bezkrāsainas, caurspīdīgas polivinilhlorīda plēves un alumīnija folijas blisteri.

Glabāšanas apstākļi: ilgtermiņa uzglabāšana (25 ± 2) °C / (60 ± 5) % RM

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	Rezultāti		
		Pirms glabāšanas	3 mēneši	6 mēneši
Apraksts	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar šuvi, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Atbilst	Atbilst, tomēr kapsulu apvalks nedaudz mīkstāks	Apvalks mīkstāks, kapsulas nedaudz uzbriedušas
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra $\lambda_{\max}$, nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Kapsulas satura vidējā masa, mg	600,0	588,5	589,3	587,6
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, %	$\pm 7,5$ robežās	$-1,78 \div +1,74$	$-2,24 \div +1,64$	$-2,35 \div +2,05$
Sairšanas laiks, min	Ne vairāk par 30	17 – 20	20 – 22	21 – 23
Karotīnu saturs preparātā, mg %	Ne mazāk par 30	36,78 $\pm$ 0,52	36,45 $\pm$ 0,90	34,83 $\pm$ 0,71
Karotīnu saturs kapsulā, μ g	Ne mazāk par 80	98,4 $\pm$ 1,4	97,5 $\pm$ 2,4	93,2 $\pm$ 1,9

8. pielikums (turpinājums).

Glabāšanas apstākļi: paātrinātā uzglabāšana (30 ± 2) °C / (65 ± 5) % RM

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	Rezultāti		
		Pirms glabāšanas	3 mēneši	6 mēneši
Apraksts	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar šuvi, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Atbilst	Atbilst, tomēr kapsulu apvalks mīkstāks	Apvalks ļoti mīksts, kapsulas uzbriedušas
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra λ_{max} , nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Kapsulas satura vidējā masa, mg	600,0	588,5	586,8	584,2
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, %	$\pm 7,5$ robežās	$-1,78 \div +1,74$	$-1,98 \div +1,65$	$-2,23 \div +1,95$
Sairšanas laiks, min	Ne vairāk par 30	17 – 20	24 – 26	28 – 35
Karotīnu saturs preparātā, mg %	Ne mazāk par 30	$36,78 \pm 0,52$	$36,75 \pm 1,20$	$34,96 \pm 0,09$
Karotīnu saturs kapsulā, µg	Ne mazāk par 80	$98,4 \pm 1,4$	$98,3 \pm 3,2$	$93,5 \pm 0,2$

9. pielikums. SBE₂ MŽK II ražošanas sērijas stabilitāte

Produkts: **Pinextrol 300 mg kapsulas**

Ražošanas sērija Nr. 1011009. Sērijas lielums: 142500 kapsulu.

Izgatavošanas datums: 10.11.09.

Primārais iepakojums: augsta blīvuma polietilēna konteineri, tilpums 150 ml, ar zema blīvuma polietilēna vākiem.

Glabāšanas apstākļi: ilgtermiņa uzglabāšana temperatūrā $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ / $(60 \pm 5) \% \text{ RM}$

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	Rezultāti		
		Pirms glabāšanas	3 mēneši	6 mēneši
Apraksts	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar šuvi, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra λ_{max} , nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Kapsulas satura vidējā masa, mg	600,0	582,3	585,8	587,2
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, %	$\pm 7,5$ robežās	$-1,65 \div +1,46$	$-2,13 \div +1,78$	$-1,69 \div +1,21$
Sairšanas laiks, min	Ne vairāk par 30	18 – 20	20 – 22	20 – 22
Karotīnu saturs preparātā, mg %	Ne mazāk par 30	$36,45 \pm 0,93$	$36,71 \pm 0,80$	$35,66 \pm 0,74$
Karotīnu saturs kapsulā, µg	Ne mazāk par 80	$97,5 \pm 2,5$	$98,2 \pm 2,2$	$95,4 \pm 2,0$

9. pielikums (turpinājums).

Glabāšanas apstākļi: paātrinātā uzglabāšana (30 ± 2) °C / (65 ± 5) % RM

Kvalitātes rādītāji	Kvalitātes prasības	Rezultāti		
		Pirms glabāšanas	3 mēneši	6 mēneši
Apraksts	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar šuvi, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra $\lambda_{\max}$, nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Atbilst	Atbilst	Atbilst
Kapsulas satura vidējā masa, mg	600,0	582,3	584,5	583,7
Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, %	$\pm 7,5$ robežās	$-1,65 \div +1,46$	$-2,65 \div +1,43$	$-1,85 \div +1,26$
Sairšanas laiks, min	Ne vairāk par 30	18 – 20	23 – 25	24 – 28
Karotīnu saturs preparātā, mg %	Ne mazāk par 30	$36,45 \pm 0,93$	$36,36 \pm 0,37$	$37,02 \pm 0,26$
Karotīnu saturs kapsulā, µg	Ne mazāk par 80	$97,5 \pm 2,5$	$97,3 \pm 1,0$	$99,06 \pm 0,69$

10. pielikums. Skuju biezā ekstrakta 300 mg kapsulu kvalitātes specifikācijas projekts

Nr. p.k.	Rādītāji	Prasības	Analīzes metode
1.	Apraksts	Ovālas formas mīkstās želatīna kapsulas ar šuvi, satur biezu masu tumši zaļā krāsā ar priežu skuju smaržu un rūgtenu garšu	Organoleptiski Kvalitātes kontroles metode, p.1.
2.	Identitāte: karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektra $\lambda_{\max}$, nm; hlorofilu un karotinoīdu raksturīga pozīcija hromatogrāfijas kolonnā	(plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 pēc karotīnu eluēšanas, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem	Kvalitātes kontroles metode, p.2.
3.	Kapsulas satura vidējā masa, mg	600,0	Ph. Eur. 2.9.5. Kvalitātes kontroles metode, p.3.
4.	Novirzes no kapsulas satura vidējās masas, %	$\pm 7,5$ robežās	Ph. Eur. 2.9.5. Kvalitātes kontroles metode, p.3.
5.	Sairšanas laiks (vide – ūdens vai mākslīgā zarnu sula ar pH 6,8), min	Ne vairāk par 30	Kvalitātes kontroles metode, p.4. Ph. Eur. 2.9.1., tests A
6.	Karotīnu saturs kapsulā, μg	Ne mazāk par 80	Kvalitātes kontroles metode, p.5.
7.	Mikrobioloģiskā tīrība: Kopējais aerobo baktēriju skaits Kopējais sēņu skaits <i>Escherichia coli</i> klātbūtne	3 A kategorija Ne vairāk par 10^3 KVV/1g preparāta Ne vairāk par 10^2 KVV/1g preparāta Nav pieļaujama 1g preparāta	Ph. Eur. 2.6.12., 2.6.13.

Primārais iepakojums:

- 1). augsta blīvuma polietilēna konteineri, tilpums 150 ml, ar zema blīvuma polietilēna vākiem;
- 2). bezkrāsainas, caurspīdīgas polivinilhlorīda plēves un alumīnija folijas blisteri.

Glabāšana: Uzglabāt temperatūrā līdz 25 °C, sargāt no mitruma un gaismas. Derīguma laiks: 2 gadi.

11. pielikums. Skuju biezā ekstrakta 300 mg kapsulu kvalitātes kontroles metodes

1. Apraksts

Kapsulu ārējo izskatu un formu nosaka vizuāli. Kapsulu satura krāsu nosaka vizuāli atstarotā izkliedētā dienas gaismā, uzziežot to uz pienstikla plates 5 mm biezā slānī. Smaržu un garšu nosaka organoleptiski temperatūrā (15 – 25) °C.

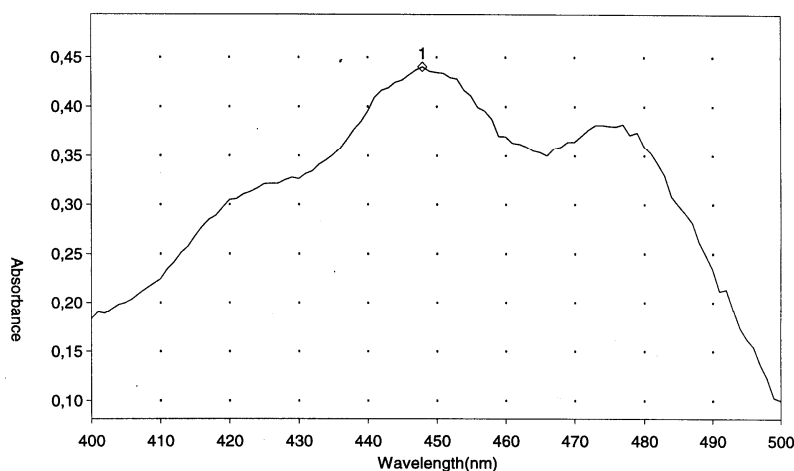
2. Identitāte

2.1. Aparatūra, materiāli un reaktīvi: skat. p. 5.1.

2.2. Analīzes gaita.

Veic parauga sagatavošanu un kolonnas hromatogrāfiju kā aprakstīts p. 5.2. un 5.4. Hlorofiliem un karotinoīdiem ir raksturīga pozīcija alumīnija oksīda hromatogrāfijas kolonnā. Pēc karotīnu eluēšanas ar Nefrāzi, pārējie karotinoīdi paliek kolonnas augšdaļā zem hlorofiliem.

Uzņem karotīnus saturoša eluāta UV/VIS gaismas absorbcijas spektru 400 – 500 nm viļņu garuma diapazonā; $\lambda_{\max}$: (plecs 425); 450 ± 3 ; 477 ± 2 (skat. 1 att.).



1. attēls. *Skuju biezā ekstrakta 300 mg kapsulas* karotīnus saturošā eluāta gaismas absorbcijas spektrs

3. Kapsulas satura dozēšanas precizitātes noteikšana

Noteikšanu veic atbilstoši Ph. Eur. 2.9.5. prasībām.

3.1. Aparatūra, materiāli un reaktīvi:

- analītiskie svāri,
- šķēres,

- pincete,
- stikla glāze, 20 ml,
- hloroforms.

3.2. Analīzes gaita.

No katras preparāta sērijas nejauši atlasa 20 kapsulu. Katru kapsulu nosver uz analītiskiem svariem. Tad katru kapsulu pārgriež, atbrīvo no pildījuma, apvalku izskalo ar hloroformu, žāvē 30 min un nosver. Aprēķina katras kapsulas pildījuma masu. Nosaka kapsulu pildījuma vidējo masu un novirzes no vidējās masas. Katras kapsulas pildījuma masas novirze no pildījuma vidējās masas nedrīkst pārsniegt $\pm 7,5 \%$.

4. Kapsulu sairšanas laika noteikšana

Noteikšanu veic atbilstoši Ph. Eur. 2.9.1., tests A prasībām.

4.1. Aparatūra, materiāli un reaktīvi:

- sairšanas laika noteikšanas aparāts,
- pH-metrs,
- attīrīts ūdens,
- kālija dihidrogēnfosfāts,
- nātrija hidroksīds,
- pankreatīns.

4.2. Mākslīgās zarnu sulas ar pH 6,8 pagatavošana (Ph. Eur. 2.9.3.).

Samaisa 250,0 ml šķīduma, kas satur 6,8 g kālija dihidrogēnfosfāta un 77,0 ml 0,2 M nātrija hidroksīda šķīduma, ar 500 ml ūdens. Pievieno 10,0 g pankreatīna, samaisa un pārbauda pH. Atšķaida līdz 1000,0 ml ar ūdeni.

4.3. Analīzes gaita.

No katras preparāta sērijas nejauši atlasa 6 kapsulas.

Lai noteiktu kapsulu sairšanas laiku, traukā ielej atbilstošo šķidrumu. Sairšanas vides temperatūra ($37 \pm 0,5$) °C. Šķidruma daudzums ir tāds, lai groziņam atrodotos augstākajā pozīcijā, apakšējais sietiņš būtu vismaz 15 mm zem šķidruma līmeņa, un groziņam atrodotos zemākajā pozīcijā, sietiņš būtu vismaz 25 mm virs trauka dibena un stobriņu augšējās malas paliktu virs šķidruma līmeņa. Katrā stobriņā ievieto kapsulu, groziņu ar stobriņiem ievieto traukā ar šķidrumu, ieslēdz ierīci un ļauj tai darboties noteiktu laiku. Tad groziņu izņem un novērtē kapsulu izskatu. Visām 6 kapsulām jāsairst 30 min laikā. Sairšana ir notikusi, ja:

- d) uz sietiņa nav atlikuma; vai

- e) uz sietiņa ir atlikums, kas sastāv no mīkstās masas, kurā nav ar pirkstiem sataustāmas cietās daļiņas vai nesamitrināts kodols; vai
- f) uz sietiņa paliek tikai fragmenti no kapsulas sienīņas.

5. Karotīnu satura noteikšana

5.1. Aparatūra, materiāli un reaktīvi:

- analītiskie svāri,
- spektrofotometrs,
- stikla glāze, 20 ml, 50 ml,
- stikla piltuve,
- stikla spieķīši,
- šķēres,
- filtrpapīrs,
- stikla hromatogrāfijas kolonna, diametrs 1 – 1,5 cm, garums 15 – 20 cm,
- mērkolba, 50 ml,
- mērkolba, 1000 ml,
- Nefrāze C2-80/120 vai līdzīgas kvalitātes šķīdinātājs,
- alumīnija oksīds, aktīvais γ - Al_2O_3 pēc *Brockmann* II pakāpes hromatogrāfijai,
- kālija dihromāts,
- attīrīts ūdens.

5.2. Hromatogrāfijas kolonnas sagatavošana.

Stikla hromatogrāfijas kolonas apakšā ievieto 1 cm biezu vates tamponu. Alumīnija oksīdu samaisa ar Nefrāzi un sagatavoto suspensiju ielej kolonnā tik daudz, lai iznāktu 7 – 10 cm augsts sorbenta slānis.

5.3. Kālija dihromāta standarta šķīduma pagatavošana.

0,3600 g (precīzs iesvars) kālija dihromāta, kas iepriekš izžāvēts pie (100 – 105) °C līdz nemainīgai masai, kvantitatīvi pārnes 1000 ml mērkolbā, kurā to izšķīdina un uzpilda ar attīrītu ūdeni līdz atzīmei. Pagatavotais šķīdums pēc krāsas atbilst šķīdumam, kura 1 ml satur 0,00208 mg β -karotīna.

5.4. Analīzes gaita.

Vienas mīkstās želatīna kapsulas pildījuma masu (precīzs iesvars, nosvērts ar precizitāti $\pm 0,0001$ g) samaisa ar 7 ml Nefrāzes un filtrē stikla glāzē. Nogulsnes uz filtra vairākas reizes mazgā ar nelielām Nefrāzes porcijām, līdz filtrāts kļūst bezkrāsains. Nefrāzes

šķīdumu iepilda hromatogrāfijas kolonnā tā, lai virs sorbenta būtu Nefrāzes slānis (lai kavētu karotīnu oksidēšanos). Hromatografē ar Nefrāzi, kamēr karotīni, kas atdalījušies no citiem pigmentiem oranždzeltenas zonas veidā, pāriet uztvērējā (50 ml mērkolbā). Hromatografēšanu pārtrauc, kad eluāts kļūst bezkrāsains. Nefrāzes šķīdumu ar karotīniem 50 ml mērkolbā uzpilda ar Nefrāzi līdz atzīmei. Iegūtā šķīduma optisko blīvumu mēra spektrofotometriski pie 450 nm viļņu garuma kivetē ar 10 mm biezu slāni. Paralēli nosaka optisko blīvumu kālija dihromāta standarta šķīdumam.

Karotīnu saturu kapsulā, pārrēķinot uz β -karotīnu, μg (Y), aprēķina pēc formulas:

$$Y = \frac{D \cdot 0,00208 \cdot 50 \cdot 1000 \cdot d}{D_1 \cdot a}$$

D – analizējamā šķīduma optiskais blīvums,

D_1 – standarta šķīduma optiskais blīvums,

0,00208 – β -karotīna saturs mg 1 ml šķīduma, kas pēc krāsas atbilst kālija dihromāta standarta parauga šķīdumam,

a – kapsulas pildījuma parauga masa, g,

d – kapsulas pildījuma masa, g.

Par analīzes rezultātu pieņem vidējo aritmētisko no trīs paraugu paralēliem mērījumiem. Karotīnu summas saturam (pārrēķinot uz β -karotīnu) kapsulā jābūt ne mazākam par 80 μg .

6. Mikrobioloģiskā tīrība

Pārbaudi veic atbilstoši Ph. Eur. 2.6.12., 2.6.13.prasībām.

PATEICĪBAS

Izsaku lielu pateicību manai zinātniskajai vadītājai – asociētai profesorei, Dr. pharm. Ilzei Bārenei – par morālo atbalstu un vērtīgiem padomiem visā darba tapšanas gaitā.

Liels paldies manai skolotājai un kolēģei Livijai Štālei par vērtīgām konsultācijām un palīdzību darba izstrādē.

Lielu paldies vēlos pateikt sadarbības partneriem no SIA BF-esse Dr. med. Jurim Rubenam, Natālijai Saženovai, Latvijas Valsts mežzinātnes institūta „Silava” zinātniekiem Dr. sc. ing. Mārim Daugavietim, Mg. chem. Ojāram Polim un Mg. silv. Ausmai Marijai Korikai, RSU patentvedei Dr. med. Ludmilai Ivanovai.

Pateicos visiem maniem kolēģiem no Zāļu formu tehnoloģijas katedras un no Farmācijas ķīmijas katedras par atsaucību un uzmundrinājumiem.

Sirsnīgs paldies manai ģimenei par atbalstu, izturību un sapratni darba tapšanas, īpaši rakstīšanas laikā.