

УДК 615.012



## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ НА БАЗЕ ЩЕЛОЧНОГО ГИДРОЛИЗА

Е.Б. Сысуюв<sup>1</sup>, Э.Ф. Степанова<sup>2</sup>, В.Д. Носкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное бюджетное учреждение «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в Свердловской области» (ФБУ «УРАЛТЕСТ») 620990, Россия, г. Екатеринбург, ул. Красноармейская, д. 2а

<sup>2</sup> Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации 3573352, Россия, г. Пятигорск, пр-кт Калинина, д. 11

E-mail: bes555@yandex.ru

Получена 20.12.2021

После рецензирования 20.04.2022

Принята к печати 01.06.2022

В статье рассматривается вопрос оптимизации технологии производства жирорастворимого витамина D – одного из наиболее востребованных объектов данной группы. Показано, что в целом существует ряд способов получения этой субстанции, хотя в России она пока не производится.

**Цель.** Выбор оптимальных условий технологического процесса для повышения эффективности трансформации белков с выделением фракции жира, содержащей жирорастворимый витамин D.

**Материалы и методы.** В качестве основных моделей исследования описаны различные виды рыбы и витамины, содержащиеся в них. Рассмотрены варианты технологических решений: апробирована возможность использования экстракции для получения субстанции витамина D. Были использованы классическая мацерация и мацерация с интенсификацией, применён метод циркуляционной экстракции и метод щелочного гидролиза. Выход целевого продукта определяли методом ВЭЖХ.

**Результаты.** Подробно рассмотрены методы получения субстанции жирорастворимого витамина D из рыбного сырья. Установлена оптимальная технологическая характеристика высвобождения витамина методом щелочного гидролиза со снижением концентрации гидролизующего щелочного компонента – калия гидроксида до 12,5%, который и обеспечил максимальный выход жировой фракции, содержащей витамин D.

**Заключение.** Применение полученной субстанции дает возможность разработки отечественных стандартных образцов, применяемых как в фармацевтической сфере, так и в сфере технического регулирования.

**Ключевые слова:** жирорастворимые витамины; стандартный образец; щелочной гидролиз; мацерация; циркуляционная экстракция; бережливое производство; переработка сырья

**Список сокращений:** ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; СО – стандартный образец; РФ – Российская Федерация; БАВ – биологически активные вещества.

## OPTIMIZATION TECHNOLOGY OF FAT-SOLUBLE VITAMINS PRODUCTION BASED ON ALKALINE HYDROLYSIS

E.B. Sysuev<sup>1</sup>, E.F. Stepanova<sup>2</sup>, V.D. Noskova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Regional Centre for Standardization, Metrology and Tests in Sverdlovsk region (FBI “URALTEST”) 2a, Krasnoarmeiskaya Str., Ekaterinburg, Russia, 620990

<sup>2</sup> Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, 11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

E-mail: bes555@yandex.ru

Received 20 Dec 2021

After peer review 20 April 2022

Accepted 1 June 2022

**Для цитирования:** Е.Б. Сысуюв, Э.Ф. Степанова, В.Д. Носкова. Совершенствование технологии производства жирорастворимых витаминов на базе щелочного гидролиза. *Фармация и фармакология*. 2022;10(3):255-266. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-3-255-266

© Е.Б. Сысуюв, Э.Ф. Степанова, В.Д. Носкова, 2022

**For citation:** E.B. Sysuev, E.F. Stepanova, V.D. Noskova. Optimization technology of fat-soluble vitamins production based on alkaline hydrolysis. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(3):255-266. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-3-255-266

In the group of fat-soluble vitamins, vitamin D is one of the most relevant objects, that is why the problem of its technology optimization is under consideration. In general, there is a number of ways to obtain this substance, although it is not produced in Russia yet.

**The aim** of the study was to select optimal process conditions to increase the efficiency of protein transformation with the isolation of a fat fraction containing fat-soluble vitamin D.

**Materials and methods.** Various types of fish and the vitamins contained in them are described as the main research models. Variants of technological solutions have been considered: the possibility of using extraction to obtain the vitamin D substance has been tested. Classical maceration and intensifying maceration have been used; the circulating extraction method and the alkaline hydrolysis method have been applied. The yield of the target product has been determined by HPLC.

**Results.** Methods for obtaining the substance of fat-soluble vitamin D from fish raw materials have been considered in detail. The optimal technological characteristics of the vitamin release by alkaline hydrolysis with a 12.5% decrease in the concentration of the hydrolyzing alkaline component – potassium hydroxide – has been established; that concentration ensured the maximum yield of the fat fraction containing vitamin D.

**Conclusion.** The use of the resulting substance makes it possible to develop domestic standard samples applicable both in the pharmaceutical field and in the field of technical regulation.

**Keywords:** fat-soluble vitamins; reference standard; alkaline hydrolysis; maceration; circulating extraction; lean manufacturing; raw material processing

**Abbreviations:** HPLC – high performance liquid chromatography; RS – reference; RF – Russian Federation; BASs – biologically active substances.

## ВВЕДЕНИЕ

Вопросы, связанные с получением и правильным использованием жирорастворимых витаминов, являются постоянно актуальными. Прежде всего, они касаются использования этих витаминных комплексов в фармацевтической, косметической и иных сферах, а также насыщенности ими современного фармацевтического рынка [1, 2]. При этом задействованы технологические направления производства жирорастворимых витаминов, в том числе и их стандартизация, где для них требуются официальные стандартные образцы (СО). Получение соответствующих СО требует технологического совершенствования, особенно применительно к разработке отечественных технологий, что предполагает возможность их импортозамещения [3].

Повышение требований к чистоте целевых продуктов усилили значимость методов стандартизации как в создании и производстве лекарственных средств, так и продуктов, используемых в смежных с фармацевтикой областях. Поэтому использование СО, роль которых в вопросах стандартизации несомненна, имеет широкий диапазон [4, 5].

Однако в настоящее время в Российской Федерации (РФ) при проведении фармацевтического анализа многих фармакологически значимых объектов доминируют зарубежные модели, что является пробелом в соответствующем нормативном регулировании. Это связано с отсутствием необходимых технологических решений в производстве СО, которые в РФ пока имеют выборочный характер [6, 7].

Одним из таких многопрофильных объектов является витамин D, несмотря на большой ассортимент его лекарственных форм и достаточно высокую востребованность в медицинской практике [8, 9]. Однако витамин D как субстанция на отечественном рынке в России пока не производится.

Жирорастворимый витамин D представлен в виде продуктов различного назначения, несмотря на то, что его содержание в них не велико, да и стабильность ограничена [10–12]. Существующую технологию получения витамина D можно разделить на два основных этапа: выделение жира и витаминов из сырья, повышение концентрации витаминов в полученной фракции. При этом объем производства витаминных концентратов в большей степени зависит от первого этапа выделения жира, что обеспечивает получение витамина из исходного сырья [9, 13]. В настоящее время основным источником получения исследуемой субстанции является рыбная промышленность [14–16].

Учитывая, что основным источником получения жирорастворимых витаминов является печень рыб, то стоит вопрос о создании соответствующей технологии с акцентами на вопросы бережливого производства (минимизацию отходов с максимальным ресурсосбережением ценного сырьевого источника) [17, 18].

В настоящее время достаточно широко практикуется получение пищевых продуктов из культивируемых видов рыб. Такие целевые продукты отмечаются высоким содержанием биологически активных веществ (БАВ), а также макро/микроэлементов и витаминов [19–21].

Существующие способы получения жиров можно разделить на 4 основные группы (рис. 1). Не исключается и комбинирование данных процессов для повышения извлечения жира, который зависит от исходного сырья и ожидаемого целевого продукта.

Представленные на рисунке 1 блоки оправдано выделяют гидролиз как основной способ получения жира и подчеркивают разнообразие его разновидностей. Собственно гидролиз делится на три вида: кис-

лотный, щелочной и ферментативный. Для получения жировой фракции с высоким содержанием группы жирорастворимых витаминов наиболее эффективными являются щелочной и ферментативный [22–24].

Согласно литературным данным [25–27], извлечение жира методом гидролиза имеет наиболее высокий выход, так как его часть находится в клетках в свободном виде, а часть – соединена с другими составляющими клетки. Сумму жиров нельзя извлечь из клетки только растворителями [19, 28, 29].

Нами было решено остановиться на щелочном гидролизе. В рамках проведения ферментативного гидролиза существуют ограничения – для переработки всех видов вторичного сырья рыбного производства невозможно выделить единый фермент, что повышает экономические издержки на получение субстанции жирорастворимого витамина D. Данный факт обуславливает выбор метода щелочного гидролиза, как наиболее экономически благоприятного.

Для использования гидролиза белковых катализаторов можно осуществлять процессы биотрансформации при более мягких условиях и исключать образование химически активных стоков [22]. Щелочным гидролизом можно перерабатывать даже истощенное сырье, при этом сохраняются натуральные антиоксиданты [25].

Несомненно, гидролиз в сырье происходит под действием собственных ферментов, так называемый автопротеолиз, но эффективность данного способа очень низкая, в связи с чем, необходимо повысить эффективность, а значит найти оптимальные условия производства [22].

**ЦЕЛЬ.** Выбор оптимальных условий технологического процесса для повышения эффективности трансформации белков с выделением фракции жира, содержащей жирорастворимый витамин D.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Определение химического состава первичного и вторичного сырья;
2. Выбор оптимального метода извлечения жира с содержанием группы жирорастворимых витаминов;
3. Количественное определение содержания жирорастворимого витамина D в полученной субстанции;
4. Сравнительный анализ полученных результатов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Объекты

Основным объектом получения субстанции жирорастворимого витамина D являлись рыбные объекты, приобретаемые у российского рыбокомбината АО «Бисеровский рыбокомбинат» и ООО «Первый рыбный». Сырье доставлялось в замороженном виде при температурном режиме хранения минус 18°C. Приобретение объектов исследований производи-

лось через сеть фирменных магазинов ООО «Первый рыбный», г. Екатеринбург, Россия.

В качестве источника получения целевого продукта использовались следующие виды рыб:

Кета – самый распространенный представитель семейства лососевых.

Содержит витамины PP, A, H, B<sub>1</sub> (тиамин), E, B<sub>2</sub>, D, B<sub>5</sub> и др.; микроэлементы: в первую очередь цинк и железо, молибден, фтор, хром, никель; макроэлементы: калий, хлор, фосфор, натрий, кальций, магний; белок, лецитин, полиненасыщенные жиры [10, 30, 31].

Горбуша (или розовый лосось) – самый распространенный представитель семейства лососевых.

Содержит витамины A, C, E, D, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, PP, омега-3 насыщенные кислоты, фосфорную кислоту, пиридоксин, кальций, магний, фосфор, серу, калий, медь, йод.

Кижуч – крупный лосось, обитающий на севере Тихого океана. В России кижуч наиболее многочислен в реках Камчатского полуострова [10, 30, 31].

Мясо богато витаминами и минералами, а также насыщенными жирными кислотами, в том числе Омега-3 [10, 30, 31].

Форель – представитель семейства лососевых, очень востребован. В настоящее время наблюдается стремление к увеличению популяции. По составу богата микроэлементами и насыщенными жирными кислотами [10, 30, 31].

Камбала – семейство камбаловые. Имеет среднюю жирность, но отличается низкой калорийностью. Содержится много липидов. Употребляя в пищу мясо камбалы, можно заменить искусственные и очень дорогие витамины, полезные тем, что в их состав добавлены жирные кислоты омега-3 и омега-6. Является также превосходным источником натурального белка [10, 30, 32].

Скумбрия – пелагическая стайная рыба из отряда скумбриевых. Это одна из самых популярных рыб с жирным (62%) и нежным мясом. Содержание белка в ее составе – 38%. Мясо скумбрии также богато: насыщенными, полиненасыщенными и мононенасыщенными жирами; водой, золой; холестерином; витаминами группы A, C, E, D, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, PP и др.; минералы йод, фосфор, кобальт, цинк, магний, сера, хлор, марганец, натрий, молибден, медь, кальций, железо, фтор [10, 30, 32].

### Используемые материалы

На этапе пробоподготовки были использованы: Стерильные пакеты – микробиологические пакеты для отбора проб (Россия, ООО «ЛабДепо»).

Инертный газ – азот, о.с.ч, 1 сорт, АО «Линде Уралтехгаз» (г. Екатеринбург, Россия).

Этап выделения исследуемого объекта:

Натрий сернистокислый безводный, х.ч., ООО «МЗХР» – бесцветные кристаллы, соль натрия и сернистой кислоты. Натрий сульфит растворяется в воде, образует кристаллогидраты. Натрия сульфит – сильный восстановитель. Применяется для обезвоживания в процессе гидролиза.

Аскорбиновая кислота (Китай, Shandong Luwei Pharmaceutical Co., LTD) – органическое соединение, основной водорастворимый антиоксидант.

Калий гидроксид, ч., Франция – щелочной раствор различной концентрации.

Вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144-2018 «Вода дистиллированная. Технические условия» Россия, ФБУ «УРАЛТЕСТ».

Этиловый спирт (95%, Россия, ООО «КОНСТАНТА-ФАРМ М») компонент гидролизующего раствора.

Экстрагенты, растворители – гексан-н (х.ч., Россия, АО «ЭКОС-1»), петролейный эфир марка 40-70 (ч., Россия, АО «ЭКОС-1»), изопропиловый спирт (х.ч., Россия, ООО «ХромЛаб»),

Этап аналитических исследований

ГСО 11779-2021 СО состава витамина D<sub>3</sub> (холекальциферол), Россия, ФБУ «УРАЛТЕСТ».

Холекальциферол ≥ 98% (HPLC), номер партии SLCJ0796, производитель Sigma-Aldrich, США.

Изопропиловый спирт (х.ч., Россия, ООО «ХромЛаб»).

Подвижная фаза – ацетонитрил:метанол (20:80). Ацетонитрил, х.ч., Россия, АО «ЭКОС-1»; метанол, х.ч., Россия, АО «ВЕКТОН».

### Оборудование

Аквадистиллятор электрический аптечный ДЭ-4-02 «ЭМО», модель 737, зав. № 2506, страна производитель – Россия, ЗАО «Электрооборудование».

Лабораторный нож с прямым лезвием 150 мм из нержавеющей стали. Страна производитель – Китай.

Ротационный испаритель IKA RV 10 auto pro V-C страна производитель – Германия, фирма IKA®-Werke GmbH & Co. С автоматическим определением температуры кипения, конденсатор с охлаждающей поверхностью 1500 см<sup>2</sup>.

Диспергатор IKA T 10 basic Ultra страна производитель – Германия, фирма IKA®-Werke GmbH & Co. С диапазоном частот вращения от 8000 до 30000 об/мин.

Ультразвуковая машина, модель 1510E-DTH, страна производитель – Швейцария, фирма Branson Ultrasonics Corporation с промышленным преобразователем на 40 кгс с регулятором частоты оптимизации ультразвукового воздействия и регулятором нагрева температуры с точностью ±4°C.

Аппарат Сокслета (экстрактор) – для экстракции нелетучих веществ из твердых образцов с помощью летучих растворителей. Страна-производитель – Россия, фирма ООО «ЭкогеосПром»

Хроматографические эксперименты проводили на хроматографе жидкостном «Стайер М», Россия, ООО «НПО Аквилон», зав. № 0950 (Свидетельство о поверке № С-СЕ/19-01-2022/126041432 от 19.01.2022 до 18.01.2023) со спектрофотометрическим детектором. Градуировку проводили при помощи стан-

дартных растворов жирорастворимых витаминов, приготовленных согласно ОФС.1.2.3.0017.15<sup>1</sup>. Жирорастворимый витамин D детектировали при длине волны 265 нм [33, 34].

### Условия хроматографирования

Подвижная фаза: метанол – ацетонитрил (80:20), хроматографическая колонка Luna C18(2) 250 мм × 4,6 мм, скорость потока – 1,0 мл/мин, температура колонки 25°C, детектирование: спектрофотометрический детектор с длиной волны 265 нм, объем вводимой пробы 20 мкл, время анализа – 12 минут.

### Дизайн исследования

Первое, базовое испытание, проводилось согласно ГОСТ 7636-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа»<sup>2</sup>. Таким образом, происходил сбор стандартизированных базовых данных по содержанию жира и витамина D в полученном продукте. Дальнейшие технологические исследования касались выбора оптимальных условий выполнения процесса.

В качестве основного объекта исследования была выбрана форель. Данный вид является культивируемым, сравнительно недорогим и доступным.

### Традиционная мацерация и мацерация с использованием интенсификации ультразвуком

В качестве предварительных способов получения целевого продукта были использованы общеизвестные варианты экстракции [35, 36].

Для проведения процесса выделения витамина D, охлажденное сырье подвергали ручному измельчению с помощью лабораторного ножа до 1,5×1,5 см, а также машинному микроизмельчению в среде инертного газа до частиц размером порядка 0,5×0,5 мм с последующей гомогенизацией. Инертная среда обеспечивалась в процессе диспергирования непрерывной подачей в емкость азота (о.с.ч., 1 сорт, АО «Линде Уралтехгаз»). Гомогенизация осуществлялась способом пакетирования в стерильные пакеты (ООО «ЛабДепо») с продувкой в течение 20–30 сек. исследуемого материала газом и последующей герметизацией. Учитывая, что при машинной обработке (очистке) на предприятии в массе остается большое количество отходов, данные продукты не извлекались, а гомогенизировались в общей массе. Измельчение проводилось с помощью высокопроизводительного диспергатора IKA с электронной регулировкой скорости обрабатываемого объекта исследования. Частота вращения диспергирующего

<sup>1</sup> Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV изд. Том 1–4. – 2018. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

<sup>2</sup> ГОСТ 7636-85. Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа. – М. Стандартинформ, 2010. – 126 с.

элемента поддерживалась в интервале 8000–8200 об/мин в течение 10 мин. Далее полученную массу помещали в лабораторный лопаточный гомогенизатор МикроБио БА-400 и подвергали процессу гомогенизации в течение 30 мин.

Подготовленный фарш рыбы подвергался мацерации органическими растворителями: изопропиловым спиртом (х.ч., ООО «ХромЛаб»), гексаном-н (х.ч., АО «ЭКОС-1»), петролейным эфиром (марка 40–70, ч., АО «ЭКОС-1»).

Мацерация осуществлялась двумя способами: собственно, мацерация и мацерация с применением интенсификации процесса. Интенсификация процесса осуществлялась посредством использованием перемешивающего устройства при 800 об/мин, а также для усиления влияния на объект применялось ультразвуковое воздействие.

Используемый ультразвуковой генератор осуществлял воздействие на исследуемый объект колебаниями высокого и низкого давления. При влиянии на жидкости волн низкого давления развивался кавитационный эффект, что способствовало усилению высвобождения жировой фракции из биологического объекта с образованием большого количества микроскопических пузырьков или полостей.

При мацерации применялись различные органические растворители: изопропиловый спирт, гексан и петролейный эфир. Объем растворителя определялся методом случайного подбора. Было проведено три серии экстрактов с объемными долями каждого экстрагента – объект/экстрагент 1:1, 1:2 и 1:3 и так для всех вышеуказанных компонентов.

### Циркуляционная экстракция

Циркуляционная экстракция осуществлялась с применением аппарата Сокслета. Экстракция проводилась петролейным эфиром до полного истощения сырья. Полноту экстракции контролировали нанесением капли стекающего из экстрактора растворителя на часовое стекло до полного отсутствия на последнем жирного следа после испарения растворителя.

Полученную жировую фракцию подвергали предварительной оценке в соответствии с ГОСТ 8714-2014 «Жир пищевой из рыбы и водных млекопитающих. Технические условия»<sup>3</sup>. Полученные образцы жировых фракций находились в пределах норм, установленных в нормативной документации для всех используемых видов рыбы. Далее полученные образцы подвергались испытанию на содержание в них витамина D в соответствии с ОФС.1.2.3.0017.15 «Методы количественного определения витаминов»<sup>4</sup>.

<sup>3</sup> ГОСТ 8714-2014. Жир пищевой из рыбы и водных млекопитающих. Технические условия. – М.: Стандартинформ, 2019. – 7 с.

<sup>4</sup> Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV изд. Том 1–4, 2018.

### Выделение витамина D методом щелочного гидролиза

Режимы щелочного гидролиза определяли следующими условиями: температурным режимом, количеством добавляемой воды и щелочи.

Недостаток воды замедляет гидролиз белковой части, но при этом активируется гидролиз жира, также и переизбыток воды – вызывает повышенный расход щелочи с увеличением ёмкостей.

В отношении температурного режима наиболее приемлемым считается двухступенчатый нагрев с двухэтапным внесением раствора щелочи. Это связано с тем, что нагрев сырьевой массы сразу до 80–90°C коагулирует белок, и, как следствие, происходит удлинение времени гидролиза и повышение расхода щелочи для разрушения уплотненной белковой части. Введение же всего щелочного раствора в начале процесса приводит к более интенсивному гидролизу жира, а не белковой части. Выделяющиеся при этом жирные кислоты также вступают в реакцию с щелочью и образуют мыла. При этом повышается расход щелочи и образуется стойкая эмульсия.

При избытке щелочи гидролиз очевиден, что напрямую касается количественного выхода витамина. Однако, в связи с происходящим омылением, он может быть снижен, так как на матрице образуются мыла, вследствие чего витамин сорбируется. Происходит адсорбция витамина образовавшимся мылом и увеличение потерь при рафинации жировой фракции гидролизата [37].

### Технология производства витамина D методом щелочного гидролиза

На первом этапе проводили оценку массовой доли жира в испытуемом объекте. Массовую долю жира определяли в соответствии с ГОСТ 7636-85<sup>5</sup>. Данный показатель был необходим для дальнейшего выравнивания процесса гидролиза.

Перед началом гидролиза 50,0 г тонко измельченный фарш форели помещали в круглодонную колбу вместимостью 250–500 мл. Нагревание проводили в два этапа на водяной бане. Первый нагрев продолжали до 40°C, что способствовало выделению жира, большая часть которого из мелкодиспергированного состояния переходила в более крупное, что замедляло омыление. Далее в подогретый фарш добавляли 100 мл спирта этилового ректифицированного (или спирта метилового), 1,0 г антиоксиданта (аскорбиновой кислоты), 40 мл раствора гидроксида калия и нагревали в течение 15–45 мин на водяной бане с обратным холодильником при температуре 80°C, что ускоряло процесс гидролиза и, как следствие, разрушало белок. Основную часть жировой фазы отделялась от белка и находилась в верхней

<sup>5</sup> ГОСТ 7636-85. Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа. – М.: Стандартинформ, 2010.

части гидролизуемой массы: нижний слой – гидролизат, в котором содержатся полипептиды, аминокислоты, минеральные вещества и мыла.

После окончания гидролиза содержимое колбы быстро охлаждали до  $(20 \pm 5^\circ\text{C})$  и количественно переносили в делительную воронку. Колбу ополаскивали водой, объем которой равен объему добавленного этилового спирта, затем воду сливали в ту же воронку. Жирорастворимые витамины экстрагировали петролевым эфиром или *n*-гексаном в течение 2 мин.

Экстракцию повторяли 3–4 раза порциями экстрагента по 100 мл. Объединенный экстракт отмывали от щелочи по 3–4 раза порциями воды по 150 мл до исчезновения щелочной реакции промывных вод.

Для удаления остаточных количеств воды, экстракт фильтровали через фильтр с 2–5 г безводного сульфата натрия (х.ч., ООО «МЗХР»). Далее экстракт упаривали досуха, используя роторный испаритель при температуре не выше  $50^\circ\text{C}$ , затем обрабатывали изопропиловым спиртом. Схема проведения экспериментальной части представлена на рисунке 2. Данные блоки подробно характеризуют технологический эксперимент, который может стать основополагающим для разработки технологического регламента и трансфера в производство.

В процессе проведения эксперимента были выбраны различные концентрации раствора гидроксида калия в интервале концентраций 12,5%, 25,0%, 50,0%. Все вышеприведенные условия – получение гомогенизированного материала для гидролиза, а также стабилизатор (аскорбиновая кислота, ч., Китай) – идентичны.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведенных исследований совершенно очевидным стал факт, что использование традиционной мацерации с применением способа интенсификации не принесло положительных результатов.

На представленных хроматограммах, в диапазоне детектирования характерных для витамина D, отклика детектора не обнаружено, что характеризует отсутствие жирорастворимого витамина D в полученной субстанции методом традиционной мацерации (рис. 3). В то время, как при контрольном определении с использованием СО, время удерживания и площадь пика определяли в диапазонах для данного СО (рис. 4).

Применение метода циркуляционной экстракции позволило выделить незначительное количество витамина D в испытуемом объекте. Содержание определяемого вещества, при использовании метода щелочного гидролиза, находится в значительно большем количестве. Дополнительный щелочной гидролиз полученной жировой фракции незначительно увеличил концентрацию витамина и не привел к

желаемому результату (табл. 1). Значение площади пика при циркуляционной экстракции варьировалось около  $0,01 \text{ AU} \cdot \text{сек.}$ , после комбинации методов с использованием того же сырьевого компонента площадь незначительно увеличилась –  $0,02 \text{ AU} \cdot \text{сек.}$

Поэтому вопрос о разработке и применении комбинированного метода получения жирорастворимой субстанции, сформированного из какого-либо экстракционного варианта с учетом базового щелочного гидролиза, видимо, не является перспективным. Поэтому авторам пришлось вернуться к щелочному гидролизу и совершенствовать технологию производства субстанции витамина D именно в рамках этого надежного способа.

Следующий, третий этап исследований состоял в применении метода щелочного гидролиза.

Из результатов эксперимента определено, что при концентрации гидроксида калия 12,5% в испытуемых образцах витамин D определяли стабильно во всех сериях анализа (табл. 2).

При контрольном анализе ГСО 11779-2021 (ФБУ «УРАЛТЕСТ»), а также холекальциферола импортного производства (Sigma-Aldrich, США), определено, что время выхода витамина D соответствует 10 мин. О количественном содержании в образцах судили по характерному показателю для ВЭЖХ – площади пика. По результатам проведенного анализа площадь пика для стандартного образца –  $9,52 \text{ AU} \cdot \text{сек.}$ , для испытуемого образца –  $0,05 \text{ AU} \cdot \text{сек.}$

Результаты хроматографического анализа субстанции, которая была в свою очередь получена в результате гидролиза 12,5% раствором гидроксида калия, были подвергнуты сравнительным исследованиям. Было выполнено исследование с образцами импортного производства. При этом оказалось, что в опытных образцах витамин D присутствует (рис. 5).

Результаты, полученные при использовании 25% раствора гидроксида калия, полностью идентичны результатам с использованием 12,5% раствора щелочи. Как и в первом случае, витамин D присутствует в исследуемых образцах и находится в стабильной форме. Повторные контрольные исследования образцов показали идентичные время удерживания и площадь пика (табл. 3).

При гидролизе образца раствором гидроксида калия концентрацией 25% количественное содержание витамина D также оценивалось по площади пика –  $0,05 \text{ AU} \cdot \text{сек.}$

При использовании 50% раствора гидроксида калия, витамин D также проявил себя стабильно, как и в первых двух экспериментах, что дает нам возможность утверждать о перспективе применения более низких концентраций щелочи.

При гидролизе образца раствором гидроксида калия концентрацией 50% площадь пика витамина D в полученной субстанции –  $0,05 \text{ AU} \cdot \text{сек.}$

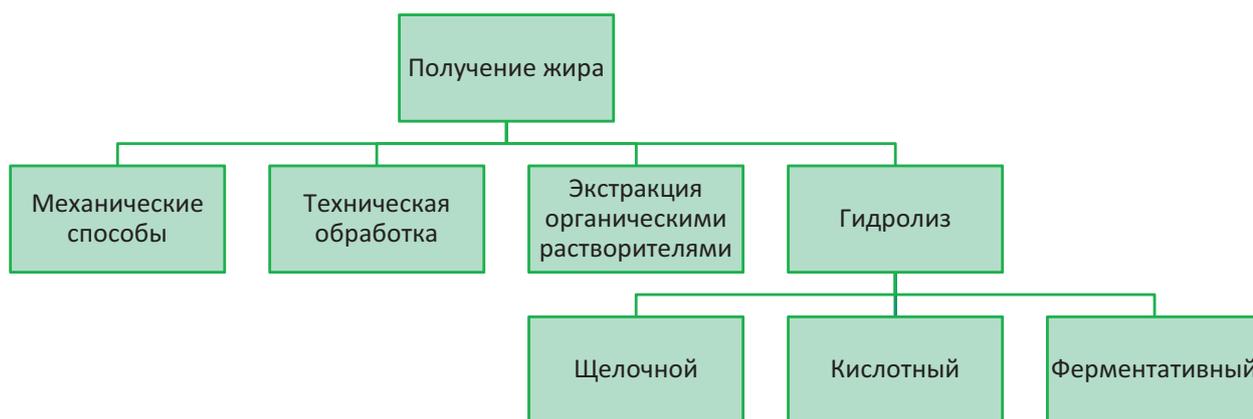


Рисунок 1 – Способы получения жира

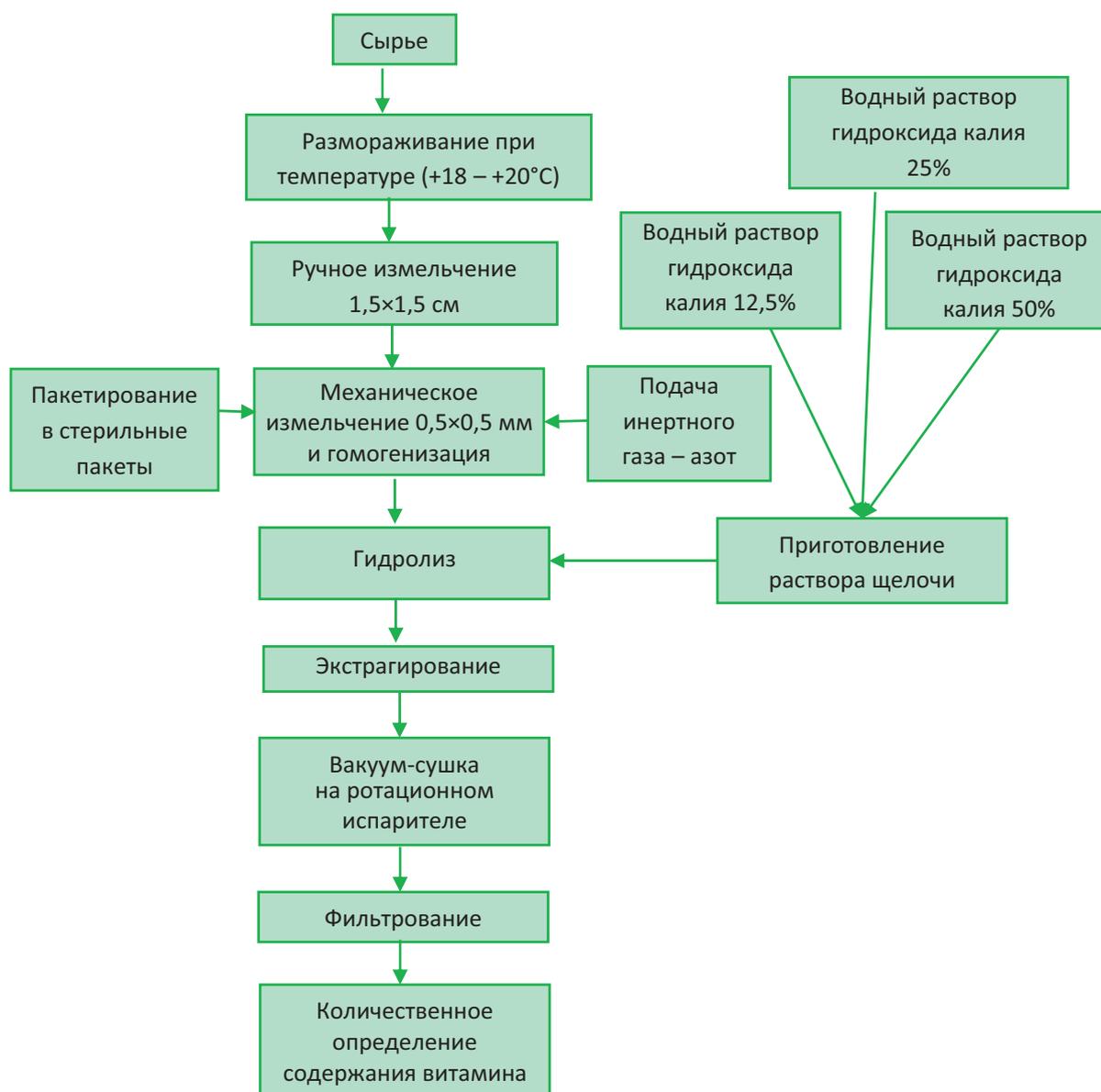


Рисунок 2 – Схема проведения экспериментальной части

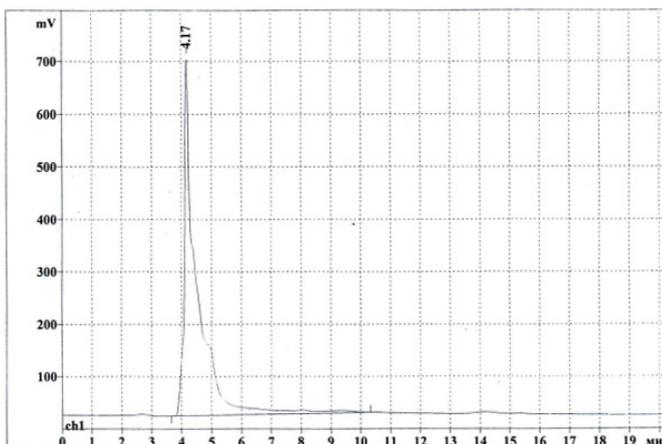


Рисунок 3 – Хроматограмма объекта прямой экстракции в изопропиловом спирте при воздействии ультразвука

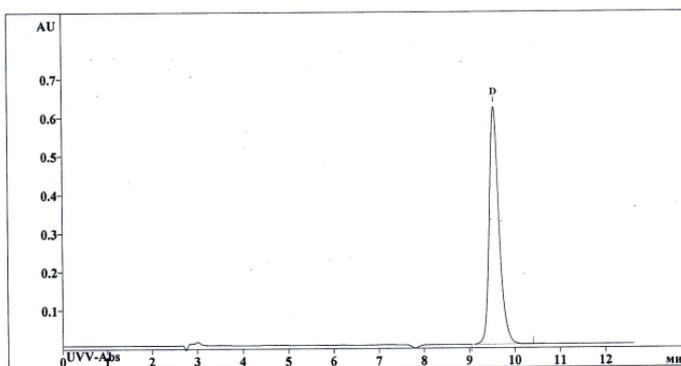


Рисунок 4 – Хроматограмма стандартного образца витамина D

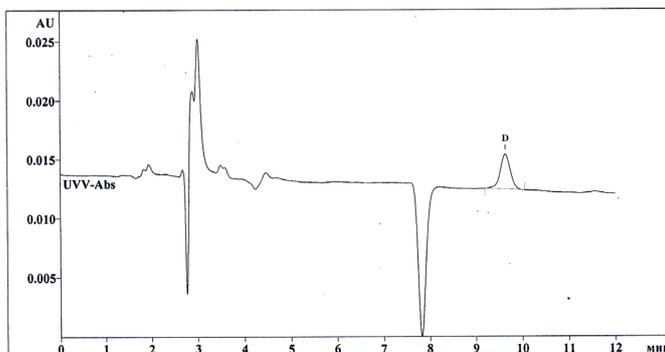


Рисунок 5 – Хроматограмма витамина D при гидролизе 12,5%

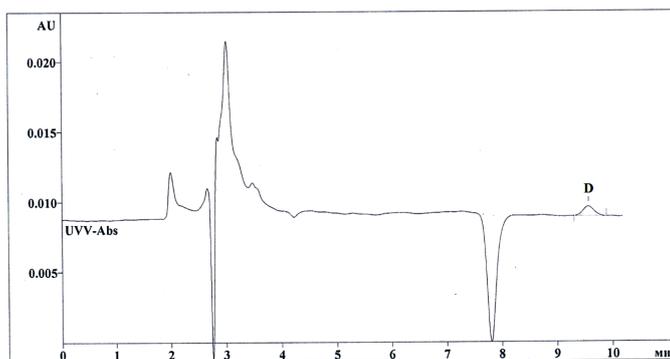


Рисунок 6 – Хроматограмма витамина D, выделенного с помощью щелочного гидролиза с концентрацией гидроксида калия 50%

Таблица 1 – Результаты, полученные при циркуляционной экстракции фарша форели

№ серии	Масса навески, г	Масса выделенной жировой фракции, г	Результат	
			Витамин D*	Витамин D после щелочного гидролиза
270222	5,0	0,076	+	+
070322	5,1	0,080	+	+
140322	5,2	0,079	+	+
210322	5,3	0,081	+	+
280322	5,2	0,082	+	+

Примечание: \* «+» – наличие витамина, «-» – отсутствие витамина.

Таблица 2 – Результаты, полученные при гидролизе фарша форели после экстракции гидроксидом калия 12,5%

№ серии	Масса навески, г	Масса выделенной жировой фракции, г	Результат
			Витамин D*
051021	50,1	2,39	+
121021	50,4	2,40	+
141021	50,6	2,40	+
191021	50,0	2,39	+
261021	50,2	2,40	+

Примечание: \* «+» – наличие витамина, «-» – отсутствие витамина.

Таблица 3 – Результаты, полученные при гидролизе фарша форели после экстракции гидроксидом калия 25,0%

№ серии	Масса навески, г	Масса выделенной жировой фракции, г	Результат
			Витамин D*
051021	50,3	1,62	+
121021	50,1	1,63	+
141021	50,4	1,66	+
191021	50,0	1,61	+
261021	50,2	1,62	+

Примечание: \* «+» – наличие витамина, «-» – отсутствие витамина.

Таблица 4 – Результаты, полученные при гидролизе фарша форели после экстракции гидроксидом калия 50,0%

№ серии	Масса навески, г	Масса выделенной жировой фракции, г	Результат
			Витамин D*
051021	50,0	1,42	+
121021	50,1	1,44	+
141021	50,2	1,40	+
191021	50,3	1,41	+
261021	50,2	1,42	+

Примечание: \* «+» – наличие витамина, «-» – отсутствие витамина.

Эффект, полученный при использовании 50% раствора гидроксида калия, идентичен первым двум результатам (табл. 4). Витамин D в стабильной форме определяли в исследуемых образцах. Параллельные исследования образцов подтвердили результат анализа.

На каждую серию анализов приходилось по 6 испытаний образцов. В таблицах 1–4 представлены средние значения массы навески для каждой серии анализа, а также за массу выделенной жировой

фракции принимали среднеарифметическое значение 6-ти параллельных испытаний, допускаемые расхождения между которыми не превышали 0,5%.

Использование различных концентраций щелочи, при производстве жирорастворимых витаминов (в том числе витамина D) позволит упростить технологический процесс выделения индивидуального вещества, что, в свою очередь, нивелирует отрицательный эффект и позволит облегчить процесс его стандартизации [8, 38].

Аналогичные результаты были получены и с другими образцами видов рыб: кетой, скумбрией, камбалой, горбушей.

Применение щелочного гидролиза позволило однозначно утверждать, что данный метод является оптимальным. Содержание основного вещества в исследуемых объектах находится в диапазоне (0,03–0,12)%. Из экспериментальных данных, полученных при выделении витамина D, следует, что оптимальная концентрация гидролизующего щелочного ингредиента – 12,5% (то есть минимальная), что позволяет увеличить количество жировой фракции, что в свою очередь, является положительным показателем при осуществлении технологического процесса.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплексный подход к исследованиям получения витамина D методами щелочного гидролиза, интенсивной мацерации, циркуляционной экстракции, позволил выбрать оптимальную технологическую схему, основанную на гидролизе белковой части испытуемого объекта и использованием схемы со сниженным количеством гидроксида калия.

Снижение технологических издержек и расходных материалов при производстве субстанции жирорастворимого витамина D позволит реализовать принципы бережливого производства и, как следствие, повысить экономическую выгоду предприятия производителя государственных СО и лекарственных веществ, а также снизить финансовую нагрузку на конечного потребителя.

### ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ВКЛАД АВТОРОВ

Е.Б. Сысуев – выполнение исследования, получение субстанции жирорастворимого витамина D, сравнительная оценка, анализ данных; Э.Ф. Степанова – сбор литературных данных, редактирование обзора; В.Д. Носкова – выполнение исследования, получение субстанции жирорастворимого витамина D, сравнительная оценка, анализ данных.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Котенева И.В., Ковтун Р.П. Фармакология поливитаминных комплексов в спортивной медицине // Сборник статей XI Международной научно-практической конференции «Научные исследования: от теории к практике». – 2017. – Т. 1, №1. – С. 76–77.
2. Петров А.Ю., Сысуев Е.Б., Новикова Н. Некоторые особенности применения стандартных образцов в фармации // Роль технического регулирования и стандартизации в эпоху цифровой экономики: сборник статей II Международной научно-практической конференции молодых ученых (Екатеринбург, 21 апреля 2020 г.). – Издательский дом «Ажур»: Екатеринбург, 2020. – С. 21–32.
3. Медведевских М.Ю., Сергеева А.С. Вопросы обеспечения метрологической прослеживаемости результатов измерений показателей качества пищевых продуктов и продовольственного сырья // Журнал «Измерительная техника». – 2020. – №3. – С. 64–70. DOI 10.32446/0132-4713.2020-3-64-70.
4. Петров А.Ю., Сысуев Е.Б., Макарова И.С. Перспективы использования государственных стандартных образцов при анализе лекарственных препаратов на примере триазавирина // Медицина, фармация и общественное здоровье: Сборник статей Второго Евразийского конгресса с международным участием, посвященного 85-летию Уральского медицинского университета. – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский государственный медицинский университет». Екатеринбург, 2015. – С. 267–270.
5. Леонтьев Д.А., Подпрудников Ю.В., Воловик Н.В. Роль стандартных образцов в обеспечении качества, лекарственных средств: регуляторные и метрологические аспекты // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – №3. – С. 180–188.
6. Сопина Н.В. Структурный анализ статей экспорта и импорта сельскохозяйственной продукции в Российской Федерации // Вузовская наука: от теории к практике: Сборник материалов региональной научно-практической конференции (Санкт-Петербург, 14–15 мая 2019 года). – Издательство: Санкт-Петербургский имени В.Б. Бобкова филиал Российской таможенной академии, 2019. – С. 247–252.
7. Волкова Р.А., Фадейкина О.В., Климов В.И., Саканян Е.И., Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Мовсесянц А.А., Бондарев В.П., Борисевич И.В., Шведов Д.В. Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2016. – Т. 16, №4. – С. 229–236.
8. Леонтьев Д.А. Система вторичных стандартных образцов в лабораториях контроля качества лекарственных средств // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2016. – №1. – С. 50–55.
9. Анчутина Е.А. Современные разработки в области стандартных образцов: обзор международных публикаций // Стандартные образцы. – 2014. – №1. – С. 27–41.
10. Гребенюк А.А., Базарнова Ю.Г. Особенности химического состава и показатели свежести лососевых рыб аквакультуры Норвегии и Карелии // Процессы и аппараты пищевых производств. – 2012. – №2(14). – С. 12.
11. Андреев Д.П., Козлович А.В. Формирование концепции информационно-аналитической базы стандарт-

- ных образцов // Ведомости Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2019. – Т. 9, №1. – С. 49–53. DOI: 10.30895/1991-2919-2019-9-1-49-53.
12. Khan M.U., Gautam G., Jan B., Zahiruddin S., Parveen R., Ahmad S. Vitamin D from Vegetable VV Sources: Hope for the Future // *Phytomedicine Plus*. – 2022. – Vol. 2. – Art. ID: 100248. DOI: 10.1016/j.phyplu.2022.100248.
  13. Долматова И. А., Зайцева Т. Н., Рябова В. Ф., Горелик О. В. Биологическая роль витаминов // *Актуальные проблемы современной науки, техники и образования*. – 2020. – №11 (1). – С. 116–119.
  14. Карлина Е.П., Арсланова Э.Р. Место и роль рыбохозяйственного комплекса в системе обеспечения продовольственной безопасности России // *Вестник Астраханского государственного технического университета*. – 2019. – №4. – С. 37–48. DOI 10.24143/2073-5537-2019-4-37-48.
  15. Abdollahi M., Wu H., Undeland I. Impact of Processing Technology on Macro- and Micronutrient Profile of Protein-Enriched Products from Fish Backbones // *Foods*. – 2021. – Vol. 10, No.5. – Art. No.950. DOI: 10.3390/foods10050950.
  16. Nakamura K., Nashimoto M., Okuda Y., Ota T., Yamamoto M. Fish as a major source of vitamin D in the Japanese diet // *Nutrition*. – 2002. – Vol. 18, No.5. – P. 415–416. DOI: 10.1016/s0899-9007(02)00751-7.
  17. Трофимова Л.И., Носкова В.Д., Сысыев Е.Б. Современная практика управления складской логистикой // *Материалы II Международной научно-практической конференции «Управление цепями поставок в транспортно-логистических системах»*. – Уральский государственный экономический университет (г. Екатеринбург), 2021 год. – С. 94–99.
  18. Steinsholm S., Oterhals Å., Underhaug J., Aspevik T. Emulsion and Surface-Active Properties of Fish Solubles Based on Direct Extraction and after Hydrolysis of Atlantic Cod and Atlantic Salmon Backbones // *Foods*. – 2020. – Vol. 10, No.1. – Art. No.38. DOI: 10.3390/foods10010038.
  19. Проскура Д.Ю., Паевская Е.В., Капустина Ю.Г. Извлечение и переработка биологически ценного сырья из двустворчатых моллюсков // *Научные труды Дальрыбвтуза*. – 2013. – №30. – С. 152–160.
  20. Venkatesan J., Lowe B., Manivasagan P., Kang K.H., Chalisserry E.P., Anil S., Kim D.G., Kim S.K. Isolation and Characterization of Nano-Hydroxyapatite from Salmon Fish Bone // *Materials (Basel)*. – 2015. – Vol. 8, No.8. – P. 5426–5439. DOI: 10.3390/ma8085253.
  21. Phadke G.G., Rathod N.B., Ozogul F., Elavarasan K., Karthikeyan M., Shin K.H., Kim S.K. Exploiting of Secondary Raw Materials from Fish Processing Industry as a Source of Bioactive Peptide-Rich Protein Hydrolysates // *Mar. Drugs*. – 2021. – Vol. 19, No.9. – Art. No.480. DOI: 10.3390/md19090480.
  22. Байдалинова Л.С. Оценка степени гидролиза белков вторичного рыбного сырья при ферментативной и гидротермической обработке // *Вестник науки и образования Северо-Запада России*. – 2018. – Т. 4, №2. – С. 101–110.
  23. Sereshti H., Toloutehrani A., Nodeh H.R. Determination of cholecalciferol (vitamin D3) in bovine milk by dispersive micro-solid phase extraction based on the magnetic three-dimensional graphene-sporopollenin sorbent // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2020. – Vol. 1136. Art. ID: 121907. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.121907.
  24. Lapeña D., Vuoristo K.S., Kosa G., Horn S.J., Eijsink V.G.H. Comparative Assessment of Enzymatic Hydrolysis for Valorization of Different Protein-Rich Industrial Byproducts // *J. Agric. Food. Chem.* – 2018. – Vol. 66, No.37. – P. 9738–9749. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b02444.
  25. Вострикова Н.Л., Кузнецова О.А., Куликовский А.В. Методические аспекты извлечения липидов из биологических матриц // *Теория и практика переработки мяса*. – 2018. – Т. 3, №2. – С. 4–21. DOI: 10.21323/2414-438X-2018-3-2-4-21.
  26. Лапшакова В.С. Биотехнологическое производство жирорастворимых витаминов А, D, Е. Актуальные вопросы фармацевтических и естественных наук: Сборник статей Всероссийской студенческой научно-практической конференции с международным участием (Иркутск, 17–21 мая 2021). – Изд-во Иркутский государственный медицинский университет, 2021. – С.284–286.
  27. Патент № 2681352 С1 Российская Федерация, МПК А23L 17/00, А23L 33/18, А23L 33/115. Способ получения пищевых добавок из вторичного рыбного сырья с применением гидролиза: № 2018103795: заявл. 31.01.2018; опубл. 06.03.2019 / С.В. Агафонова, Л.С. Байдалинова, В.В. Волков [и др.]; заявитель Общество с ограниченной ответственностью «Биотех».
  28. Грядицкая Л.В. Переваримость питательных веществ и обмен веществ у кроликов при скармливании белмин // В сборнике: *Перспективы развития отрасли и предприятий АПК: отечественный и международный опыт*. Сборник материалов Международной научно-практической конференции (Нижний Новгород, 19–20 декабря 2019 года). – Издательство: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия», 2020. – С. 80–85.
  29. Scurria A., Lino C., Pitonzo R., Pagliaro M., Avellone G., Ciriminna R. Vitamin D3 in Fish Oil Extracted with Limonene from Anchovy Leftovers // *ACS Omega*. – 2019. – No.25. – P. 1–5. DOI: 10.1016/j.cdc.2019.100311.
  30. Костецкий Э.Я. Состав фосфолипидов и жирных кислот фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина темной камбалы *Pleuronectes obscura* при термоадаптации // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. – 2018. – Т. 54, №2. – С. 96–104.
  31. Menoyo D., Sanz-Bayón C., Nessa A.H., Esatbeyoglu T., Faizan M., Pallauf K., De Diego N., Wagner A.E., Ipharraguerre I., Stubhaug I., Rimbach G. Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) as a marine functional source of gammatacopherol // *Mar. Drugs*. – 2014. – Vol. 12, No.12. – P.5944–5959. DOI: 10.3390/md12125944.
  32. Шульгина Л.В., Давлетшина Т.А., Павловский А.М., Солодова Е.А., Павел К.Г. Состав липидов и жирных кислот в мышечной ткани японской скумбрии *Scomber japonicus* // *Известия ТИНРО*. – 2019. – №196. – С. 193–203. DOI: 10.26428/1606-9919-2019-196-193-203.
  33. Востоков В.М., Карташев В.Р. Хроматографический контроль биохимической активности жирорастворимых витаминов (А, D, Е) в пищевой и кормовой продукции // *Известия высших учебных заведений. Серия:*

- Химия и химическая технология. – 2006. – Т. 49, №4. – С. 115–118.
34. Кульнева Ю.Ю. Оптимизация определения жирорастворимых витаминов // Биоразнообразии, биоресурсы, вопросы биотехнологии и здоровье населения Северо-Кавказского региона: Материалы VI (63-й) ежегодной научно-практической конференции «Университетская наука – региону» Северо-Кавказского федерального университета. – Издательство Северо-Кавказский федеральный университет, 2018. – С. 383–387.
35. Дубашинская Н.В., Хишова О.М., Шимко О.М. Характеристика способов получения экстрактов и их стандартизация // Вестник фармации. – 2007. – Т. 2, №36. – С. 70–79.
36. Патент № 2062295 С1 Российская Федерация, МПК C09F 5/02, C11B 1/10. Способ экстракции жиров и масел из натуральных веществ: № 93056645/13: заявл. 07.10.1993: опубл. 20.06.1996 / Х. Юрген, К. а. Ян, Ф. Хайнц-Рюдигер; заявитель СКВ Тростберг А.Г.
37. Волков В.В., Гримм Т., Ланге Т., Мезенова О.Я., Хёлинг А. Изучение различных способов гидролиза вторичного сырья тихоокеанских лососевых рыб на примере голов нерки (*Oncorhynchus nerka*) // Известия КГТУ. – 2017. – №45. – С. 136–147.
38. Сысуюев Е.Б., Петров А.Ю., Тхай В.Д. Разработка стандартных образцов витамина Е и оценка возможности использования различных методов анализа // XX Юбилейная международная конференция по науке и технологиям Россия-Корея-СНГ (19–21 октября 2020, г. Москва). – Научно-техническое общество «АНТОК», 2020. – С. 27–41.

## АВТОРЫ

**Сысуюев Евгений Борисович** – кандидат фармацевтических наук, начальник отдела оценки соответствия ФБУ «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в Свердловской области» (ФБУ «УРАЛТЕСТ»). ORCID ID: 0000-0001-7648-0088. E-mail: bes555@yandex.ru

**Степанова Элеонора Федоровна** – доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической технологии с курсом ме-

дицинской биотехнологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-4082-3330. E-mail: efstapanova@yandex.ru

**Носкова Владислава Дмитриевна** – инженер отдела оценки соответствия ФБУ «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в Свердловской области» (ФБУ «УРАЛТЕСТ»). ORCID ID: 0000-0002-9658-6821. E-mail: v.d.noskova@mail.ru