



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A23K 10/30 (2020.02); A23K 20/158 (2020.02); A23K 20/174 (2020.02); A23K 40/30 (2020.02); A61K 9/51 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2018135575, 17.03.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
17.03.2017

Дата регистрации:  
01.04.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
25.03.2016 FR 16/52592

(43) Дата публикации заявки: 27.04.2020 Бюл. № 12

(45) Опубликовано: 01.04.2021 Бюл. № 10

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 25.10.2018

(86) Заявка РСТ:  
FR 2017/050622 (17.03.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2017/162963 (28.09.2017)

Адрес для переписки:  
191002, Санкт-Петербург, а/я 5, ООО "Ляпунов  
и партнеры"

(72) Автор(ы):

ПРЕВЕРО Дамьен (FR),  
РОЗИЛЬО Вероник (FR)

(73) Патентообладатель(и):

АДИССЕО ФРАНС С.А.С. (FR)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: FR 2924943 A1, 18.12.2007. US  
20120202694 A1, 09.08.2012. EP 1552820 A1,  
13.07.2005. EP 1018363 A1, 12.07.2005. OGAWA  
S. et al, Production and Characterization of O/W  
Emulsions Containing Droplets Stabilized by  
Lecithin-Chitosan-Pectin Multilayered Membranes  
// J. Agric. Food Chem. 2004, 52, p.3595-3600. RU  
2557900 C1, 27.07.2015.

(54) НАНОКАПСУЛЫ ЖИРОРАСТВОРИМОГО АКТИВНОГО ИНГРЕДИЕНТА, ИХ  
ПРОИЗВОДСТВО И ВИДЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области биотехнологии. Предложены коллоидная суспензия нанокapsул для введения активного ингредиента, нанокapsулы и микрочастицы для введения активного ингредиента, а также применение указанных нанокapsул и микрочастиц в питании животных. Коллоидная суспензия нанокapsул включает нанокapsулы. Нанокapsулы содержат состоящую из жирорастворимого активного ингредиента и ионного поверхностно-активного вещества масляную фракцию,

окружающий масляную фракцию катионный или анионный гидрофильный полимер, где заряды ионного поверхностно-активного вещества и гидрофильного полимера являются противоположными, а содержание активного ингредиента составляет по меньшей мере 5 мас.% относительно сухой массы нанокapsул. Микрочастицы содержат нанокapsулы и лактозу. Изобретения обеспечивают повышенную биодоступность активной формы активного ингредиента. 4 н. и 13 з.п. ф-лы, 6 ил., 4 табл., 6

**R U 2 7 4 5 8 4 4 C 2**

пр.

**R U 2 7 4 5 8 4 4 C 2**



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*A23K 40/30* (2016.01)*A23K 10/30* (2016.01)*A23K 20/158* (2016.01)*A23K 20/174* (2016.01)*A61K 9/51* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A23K 10/30* (2020.02); *A23K 20/158* (2020.02); *A23K 20/174* (2020.02); *A23K 40/30* (2020.02); *A61K 9/51* (2020.02)

(21)(22) Application: **2018135575**, 17.03.2017

(24) Effective date for property rights:  
**17.03.2017**

Registration date:  
**01.04.2021**

Priority:

(30) Convention priority:  
**25.03.2016 FR 16/52592**

(43) Application published: **27.04.2020** Bull. № 12(45) Date of publication: **01.04.2021** Bull. № 10(85) Commencement of national phase: **25.10.2018**

(86) PCT application:  
**FR 2017/050622** (17.03.2017)

(87) PCT publication:  
**WO 2017/162963** (28.09.2017)

Mail address:  
**191002, Sankt-Peterburg, a/ya 5, OOO "Lyapunov i partnery"**

(72) Inventor(s):

**PREVERAUD Damien (FR),  
ROSILIO Veronique (FR)**

(73) Proprietor(s):

**ADISSEO FRANCE S.A.S. (FR)**

(54) **NANO-CAPSULES OF FAT-SOLUBLE ACTIVE INGREDIENT, MANUFACTURE AND TYPES OF USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: proposed are a colloid nano-capsule suspension for administering active ingredient, nano-capsules and micro-particles for administering active ingredient, and use of said nano-capsules and micro-particles in nutrition of animals. Colloid nano-capsule suspension includes nano-capsules. Nano-capsules contain an oil fraction composed of a fat-soluble active ingredient and an ion surface-active agent, a cation or

anion hydrophylic polymer surrounding the oil fraction, wherein the charges of the ion surface-active agent and the hydrophylic polymer are opposite and the content of the active ingredient is no less than 5 wt. % relative to the dry mass of the nano-capsules. Micro-particles contain nano-capsules and lactose.

EFFECT: inventions provide increased biological accessibility of the active form of the active ingredient.

17 cl, 6 dwg, 4 tbl, 6 ex

Изобретение относится к нанокапсулам жирорастворимого активного ингредиента, способу их производства и видам применения.

Во многих областях техники, таких как фармацевтическая, косметическая и агропищевая промышленность и, в частности, в области питания животных очень широко применяются такие молекулы, как витамины, жирные кислоты, эфирные масла. Например, витамины А и Е обычно применяются для производства корма, способствующего росту и здоровью животных.

Гидрофобная природа и уязвимость по отношению к условиям окружающей среды, в частности к нагреванию и химическому воздействию в процессе формирования их смеси и хранения, а также в процессе их применения, делает инкапсуляцию молекул необходимой.

Витамин Е или токоферол (сокращенно TOL), существующий преимущественно в форме  $\alpha$ -токоферола ( $\alpha$ TOL), в естественном состоянии представляет собой маслянистую, липофильную, смешиваемую во всех соотношениях жидкость в любой гидрофобной или липидной фазе. Он крайне нестабилен, легко окисляется и в окисленном состоянии утрачивает большую часть своей биологической активности. Его биодоступность у животных не превышает 50% при пероральном приеме, поскольку, быстро окисляясь, он главным образом абсорбируется в окисленной неактивной форме. Кроме того, при пероральном приеме витамин Е находится в форме более стабильного производного, обычно выбранного из сложных эфиров, например ацетата, и солей витамина Е.

Витамин А существует в нескольких формах, в частности в виде сложного эфира, и находится в одной из наиболее стабильных форм - в форме ретинола ацетата, которая чаще всего потребляется домашним скотом (птицей, свиньями и крупным рогатым скотом). Однако его чувствительность к окислению, температуре, свету, кислотам сохраняется. Таким образом, при применении в фармацевтической области или в питании животных он очень быстро разлагается, как только попадает под действие первых жестких условий, в частности кислой среды, пищеварительной системы, в результате чего биодоступная форма витамина А не образуется.

Давно известно, что в целях лучшего сохранения этих чувствительных активных ингредиентов их можно защитить посредством покрытия или инкапсуляции. Для инкапсуляции витаминов, в частности витаминов А и Е, разработаны и широко применяются различные средства, такие как средства, включающие белки.

Однако авторы изобретения все еще находятся в поисках композиции жирорастворимого активного ингредиента, который обладал бы высокой биодоступностью.

Авторы изобретения искали новую композицию таких активных ингредиентов, способную повышать их абсорбцию, в частности абсорбцию в кишечнике.

Поскольку большинство этих активных ингредиентов обычно применяют в защищенной форме, еще более существенной была разработка композиции, позволяющей указанным активным ингредиентам абсорбироваться в их свободной активной форме, что означает, что гидролиз защищенной формы и ее абсорбция должны происходить почти одновременно.

Авторами изобретения впервые обнаружено, что такие активные ингредиенты можно включать в нанокапсулы с высоким содержанием указанных активных ингредиентов, и это можно осуществлять чистым способом в том смысле, что в нем не используют никаких органических растворителей. Впоследствии авторы изобретения разработали нанокапсулы, способные эффективным образом высвобождать активную форму активного ингредиента, а именно форму, удовлетворяющую всем описанным выше

требованиям.

Таким образом, изобретение относится к композиции с высоким содержанием жирорастворимого(-ых) активного(-ых) ингредиента(-ов) в форме нанокапсул, который в предпочтительном варианте осуществления обладает повышенной биодоступностью по сравнению с композициями, представленными в настоящее время на рынке.

Изобретение дополнительно нацелено на осуществление промышленно применимого и экологически безвредного способа получения таких нанокапсул. Кроме того, разработанный авторами изобретения способ приводит к получению нанокапсул, обладающих низким остаточным влагосодержанием, предпочтительно менее 8%, что обеспечивает их стабильность со временем независимо от условий хранения.

В зависимости от области применения активного ингредиента нанокапсулы по изобретению могут осуществляться в форме для более простого обращения, например, в форме микрочастиц, в частности, путем адсорбции указанных нанокапсул на носителе. В последующем описании термин «частица» будет закреплен за любой формой указанных наночастиц, и в качестве примера такие частицы представляют собой микрочастицы, содержащие нанокапсулы по изобретению. Таким образом, если активный ингредиент предназначен для питания животных, особенно преимущественным являются нанокапсулы, включенные в сухие частицы, характеризующиеся отличной смешиваемостью для их включения в премикс. При данном показании к применению такие частицы представляют собой микрочастицы, средний размер которых составляет менее 300 мкм.

Теперь различные объекты изобретения будут описаны более подробно.

Далее изобретение описано более конкретно в отношении витамина Е, но очевидно, что его объем не ограничен им, и изобретение применимо к любому жирорастворимому активному ингредиенту и любой смеси таких веществ.

Как указано выше, изобретение относится к наночастицам, содержащим по меньшей мере один жирорастворимый ингредиент в высокой концентрации, который является стабильным и может обладать высокой биодоступностью. Наночастицы по изобретению могут находиться в форме коллоидной суспензии или в сухой форме после высушивания этой суспензии.

Как в форме коллоидной суспензии, так и в сухой форме указанные нанокапсулы содержат по меньшей мере одну масляную фракцию, включающую или состоящую из жирорастворимого ингредиента и ионного поверхностно-активного вещества (ПАВ), и один предпочтительно гидрофильный полимер, окружающий указанную масляную фракцию.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что для того, чтобы сделать витамин Е биодоступным или по меньшей мере повысить его биодоступность, нанокапсулы должны дополнительно содержать по меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество. Разумеется, в зависимости от показаний к применению активного ингредиента эта биодоступность может быть нежелательной или даже недопустимой, и в этом случае нанокапсулы не будут содержать неионное ПАВ.

Как уже упоминалось, нанокапсулы по изобретению позволяют переносить любой жирорастворимый активный ингредиент. Таким образом, этот ингредиент может быть выбран из:

жирорастворимых витаминов, таких как витамины А, D, Е, К, их производных, в частности сложных эфиров, например ацетата, пропионата или сукцината, а также их метаболитов, таких как ретиналь, ретиновая кислота, 25-гидроксихолекальциферол, 1,25-дигидроксихолекальциферол;

каротиноидов;

эфирных масел, таких как эфирные масла тимьяна, душицы, розмарина, чеснока, камелии, горчицы, имбиря, куркумы, винограда, цитрусовых плодов, эспарцета, юкки, полыни, корицы, мяты, гвоздичного дерева, ягод, кумина и эхинацеи;

5 насыщенных, моновенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот; жирных масел.

Если активный ингредиент представляет собой жидкость или, вероятно, становится жидким при нагревании, оно может состоять из собственной масляной фазы, в которой будет присутствовать ионное поверхностно-активное вещество.

10 Если активный ингредиент находится не в жидком состоянии при температуре получения нанокапсул, то его можно предварительно солюбилизировать в масле, как правило, в инертном масле, которое будет использоваться в качестве носителя. В качестве примера это масло может представлять собой триолеин.

Преимущество нанокапсул по изобретению заключается в том, что содержание в 15 них активного ингредиента может находиться в диапазоне от минимум, например, 5 мас. % до более 50 мас. % или даже по меньшей мере 90 мас. % относительно сухой массы нанокапсул. Это содержание определяется в зависимости от назначения нанокапсул и, как правило, составляет по меньшей мере 5 мас. %, предпочтительно по 20 по меньшей мере 25 мас. % и более предпочтительно по меньшей мере 50 мас. % или даже по меньшей мере 70 мас. %, даже по меньшей мере 90 мас. % относительно сухой массы нанокапсул.

Указанное ионное поверхностно-активное вещество предпочтительно выбрано из ПАВ, молекулярная масса которых составляет максимум 1500 г/моль или даже максимум 1000 г/моль. Выше 1500 г/моль нанокапсулы формируются с трудом. Среди этих 25 предпочтительных поверхностно-активных веществ могут быть фосфатидилхолины, такие как яичный лецитин или соевый лецитин, или гексадецилтриметиламмоний бромид. Положительно или отрицательно заряженное ионное поверхностно-активное вещество выбрано так, чтобы его заряд был противоположен заряду полимера.

Указанное неионное поверхностно-активное вещество предпочтительно выбрано 30 из блок-сополимеров полиоксиэтилен-полиоксипропилен, смесей блок-сополимеров полиоксиэтилен (ПОЭ)-полиоксипропилен (ПОП), Твин-80, сложных эфиров жирных кислот и сахарозы и, в частности пальмитатов и стеаратов, и любой их смеси. В рамках этого определения предпочтительные поверхностно-активные вещества выбраны из сополимеров формулы  $\text{ПОЭ}_x\text{-ПОП}_y\text{-ПОЭ}_x$ , где  $x$  находится в диапазоне от 75 до 85, и 35  $y$  находится в диапазоне от 25 до 35, сополимеров формулы  $\text{ПОЭ}_x\text{-ПОП}_y\text{-ПОЭ}_x$ , где  $x$  находится в диапазоне от 55 до 65, и  $y$  находится в диапазоне от 35 до 45, и сополимеров формулы  $\text{ПОЭ}_x\text{-ПОП}_y\text{-ПОЭ}_x$ , где  $x$  находится в диапазоне от 112 до 123, и  $y$  находится в диапазоне от 40 до 50, а также сложных эфиров жирных кислот и сахарозы, имеющих 40 в продаже под торговыми марками SISTERNA<sup>®</sup> SP70 и PS750.

Полимер(-ы), позволяющий(-ие) получить нанокапсулы в соответствии с изобретением, выбран(-ы) из катионных или анионных полимеров, где заряд полимера противоположен заряду ионного поверхностно-активного вещества. Предпочтительно это полимеры природного происхождения, таким образом, предпочтительно это один 45 или более полимеров выбранных из хитозана, альгината, пектина, крахмала, целлюлозы, казеина и их комбинаций. Таким образом, предпочтительные комбинации полимера и ионного ПАВ состоят из хитозана и яичного лецитина и альгината и цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ).

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения содержание в суспензии неионного ПАВ, как определено выше, составляет по меньшей мере 15 мас. % относительно сухой массы нанокапсул.

Другой объект изобретения состоит из нанокапсул, полученных в результате  
5 высушивания описанной выше коллоидной суспензии. Эти нанокапсулы, таким образом, содержат по меньшей мере масляную фракцию, включающую или состоящую из жирорастворимого активного ингредиента, ионного поверхностно-активного вещества, необязательно неионного поверхностно-активного вещества и полимера, предпочтительно гидрофильного полимера, причем указанные нанокапсулы получены  
10 путем высушивания коллоидной суспензии по изобретению. Высушивание преимущественно осуществляют в присутствии лактозы, причем нанокапсулы по изобретению адсорбируют на лактозе.

В изобретении также предложены частицы, содержащие нанокапсулы, как те, что описаны выше, которые адсорбированы на носителе. Носитель может быть выбран из  
15 любого инертного носителя, такого как, например, лактоза. В предпочтительном варианте осуществления эти частицы представляют собой микрочастицы, содержащие нанокапсулы по изобретению, адсорбированные на лактозе.

Способ по изобретению для получения нанокапсул, как в виде коллоидной суспензии, описанной выше, так и в сухом состоянии после обработки такой суспензии, является  
20 еще одним объектом изобретения.

Таким образом, способ получения коллоидной суспензии нанокапсул включает следующие стадии:

Наличие, с одной стороны, первой фазы, содержащей по меньшей мере масляную фракцию, включающую или состоящую из по меньшей мере жирорастворимого  
25 активного ингредиента и ионного поверхностно-активного вещества, и, с другой стороны, второй водной фазы, содержащей по меньшей мере полимер и необязательно неионное поверхностно-активное вещество, где молярная концентрация указанного ионного ПАВ и одного из неионных ПАВ, если целесообразно, больше или равна 100-кратной критической концентрации мицеллообразования (ККМ) указанного(-ых) ионного  
30 (-ых) ПАВ и указанного(-ых) неионного(-ых) ПАВ соответственно; при этом активный (-ые) ингредиент(-ы), ионные поверхностно-активные вещества, неионные поверхностно-активные вещества и полимеры соответствуют приведенным выше определениям.

Формирование крупнозернистой эмульсии, которую впоследствии гомогенизируют под высоким давлением для образования коллоидной суспензии нанокапсул.

35 Определение ККМ может быть выполнено любым методом, хорошо известным специалистам в данной области техники, например, путем измерения поверхностного натяжения с помощью тензиометра по методу пластины или кольца.

Если активный(-ые) ингредиент(-ы) находится(-ятся) не в жидком состоянии при комнатной температуре или обладает(-ют) слишком большой вязкостью, масляную и  
40 водную фазы доводят до температуры в диапазоне от 60 до 70°C, позволяя активному (-ым) ингредиенту(-ам) расплавиться.

Эмульсию, называемую крупнозернистой эмульсией, получают путем простого перемешивания водной и масляной фаз. После этого проводят ее гомогенизацию под высоким давлением, например, в течение по меньшей мере 6 минут при давлении, по  
45 меньшей мере равном 600 бар.

Чтобы получить сухие нанокапсулы по изобретению из коллоидной суспензии нанокапсул, как описано выше, указанные нанокапсулы высушивают распылением в присутствии лактозы. Этим способом получают суспензии, которые не являются липкими

и могут храниться при комнатной температуре.

Изобретение также относится к видам применения таких нанокапсул. Они представляют большой интерес в питании животных, в частности, моногастричных животных. При данном показании к применению их используют в форме частиц, и в частности в форме микрочастиц, как описано выше.

Изобретение проиллюстрировано, и его преимущества освещены в приведенных ниже примерах, показывающих получение нанокапсул альфа-токоферола ацетата ( $\alpha$ ТАС) и их характеристик в питании животных в тест-системах *in vitro* и *in vivo*.

На Фиг. 1 показана биодоступность *in vitro* ТАС для различных композиций ТАС.

На Фиг. 2 показана степень гидролиза *in vitro* ТАС в TOL для различных композиций ТАС.

На Фиг. 3 показана концентрация  $\alpha$ TOL в плазме (в мкмоль/л) у крыс после введения различных композиций ТАС путем принудительного кормления.

На Фиг. 4 показана концентрация  $\alpha$ TOL в плазме (в мкг/мл) у петухов после введения различных композиций ТАС путем принудительного кормления.

На Фиг. 6 показана концентрация  $\alpha$ TOL в плазме (в мкг/мл) у цыплят после введения различных композиций ТАС в составе корма.

В приведенных ниже примерах проведен анализ различных показателей и, в частности, биодоступности витамина Е.

Биодоступность жирорастворимого активного ингредиента, такого как витамин Е или производное витамина Е, выражена в виде концентрации витамина Е, высвобождаемого в кровь, относительно концентрации витамина Е, присутствующего в рационе животного, или относительно концентрации, выраженной в виде эквивалента витамина Е производного витамина Е, введенного в рацион питания животного, в случае введения производного витамина. При таком представлении биодоступности витамина Е, таким образом, учитывают абсорбцию витамина Е или производного витамина Е в кишечнике во время прохождения через пищеварительный тракт.

Пример 1: Получение нанокапсул в соответствии с изобретением

Композиция

Нанокапсулы, полученные в данном примере, обозначены индексами С24, А37 и С40.

Их получают из коллоидной суспензии, содержащей по меньшей мере:

- ТАС

- ионное поверхностно-активное вещество, выбранное из яичного лецитина (Lipoid Е80) и гексадецилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ),

- для нанокапсул С24 и А37 неионное поверхностно-активное вещество Lutrol<sup>®</sup>-F68,

- по меньшей мере один ионный гидрофильный полимер, выбранный из (катионного) хитозана и (анионного) альгината натрия,

причем указанную коллоидную суспензию впоследствии высушивают в присутствии лактозы.

Композиция этих наночастиц показана в следующей таблице 1, где содержание ингредиентов выражено в виде мас. % (мас./мас. сухого вещества):



Таблица 1

Частицы		C24	A37	C40
Активный ингредиент	ТАС	24	37	39

Ионное ПАВ	Lipoid E80	12	-	10
	ЦТАБ	-	4,5	-
Неионное ПАВ	Lutrol®-F68	15	23	-
Полимер	Хитозан	13	-	10
	Альгинат натрия	-	8,1	
Носитель	Лактоза	36	27,4	41

#### Получение

Способ получения наночастиц имеет 3 следующие стадии:

- получение наноэмульсии;
- получение коллоидной суспензии нанокапсул; и
- высушивание нанокапсул.

#### Протокол получения нанокапсул C24 и A37:

Получение наноэмульсии:

Для нанокапсул C24:

- ионное поверхностно-активное вещество Lipoid E80 диспергируют в ТАС при перемешивании при помощи турбины, и температуру дисперсии доводят до 65°C, чтобы получить масляную фазу,

- неионное поверхностно-активное вещество (Lutrol® F68) растворяют в воде и доводят температуру раствора до 65°C, чтобы получить водную фазу.

Для нанокапсул A37:

- температуру ТАС, составляющего масляную фазу, доводят до 65°C, и диспергируют в нем ионное поверхностно-активное вещество ЦТАБ,

- неионное поверхностно-активное вещество (Lutrol® F68) растворяют в воде и доводят температуру раствора до 65°C, чтобы получить водную фазу,

затем для нанокапсул C24 и A37:

- водную фазу добавляют к масляной фазе при перемешивании и формируют первичную или крупнозернистую эмульсию с помощью турбины Reyneri при 600 об./мин при 65°C в течение 15 минут,

- эмульсию переносят в гомогенизатор высокого давления и гомогенизируют при давлении 600 бар в течение 6 минут при 65°C, чтобы получить наноэмульсию.

Получение коллоидной суспензии нанокапсул:

- наноэмульсию, полученную выше, разбавляют 1:10 раствором Lutrol® F68,
- добавляют уксусный раствор хитозана в концентрации 0,05 г/л для нанокапсул C24 или добавляют раствор альгината натрия в концентрации 1,8 г/л для нанокапсул A37

при перемешивании при помощи турбины в течение 2 часов при комнатной температуре для получения коллоидной суспензии нанокапсул по изобретению.

Высушивание нанокапсул:

- нанокапсулы высушивают распылительной сушкой на лактозе; параметры представляют собой: расход насоса 15%, температура на входе 150°C, скорость потока 7 мл/мин и скорость потока сжатого воздуха 500 л/ч.

Протокол получения нанокапсул C40:

Нанокапсулы C40 получают описанным выше способом для нанокапсул C24 за исключением того, что неионное поверхностно-активное вещество не добавляют.

Определение характеристик нанокапсул:

Нанокапсулы характеризуют по размеру, указанному в приведенной ниже таблице 2, на двух стадиях способа получения, на первой - при формировании наноэмульсии до добавления полимера и на второй - в конце способа до высушивания нанокапсул:

Таблица 2

Наночастицы	C24	A37	C40
Размер нанокапель до добавления полимера (нм)	219	236	123
Размер нанокапсулы до высушивания (нм)	355	342	163

В следующих примерах преимущество композиций ТАС в соответствии с изобретением проиллюстрировано на основании оценки биодоступности ТАС.

Биодоступность ТАС из композиции соответствует доле TOL, абсорбируемой слизистой оболочкой кишечника, которая будет использована для метаболизма клеток и функционирования органов. Эта биодоступность представляет собой комбинацию различных факторов и, в частности, биодоступности ТАС, то есть присутствующей в композиции доли витамина Е (в форме ТАС), солюбилизированного в смешанных мицеллах, и гидролиза ТАС в TOL гидролазой карбоксиэфиров (СЕН), секретируемой в пищеварительной системе.

Пример 2: Биодоступность ТАС в композициях ТАС, оцениваемая в тест-системах *in vitro*

Это исследование описано в Desmarchelier et al., 2013. Mol. Nutr. Food Res. 2013, 57, 1237-1245.

В этих тест-системах *in vitro* готовят смешанные мицеллы, содержащие различные композиции ТАС примера 1, что позволяет воспроизводить условия расщепления путем моделирования мицелл, задействованных в кишечнике.

Биодоступность витамина Е рассчитывают после расщепления *in vitro* корма, содержащего различные композиции. Ее определяют на основании соотношения витамина Е, определенного методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), находящегося в мицеллярной фазе, и витамина Е, определенного методом ВЭЖХ, присутствующего в дигестате, полученном в конце дуоденальной фазы.

Анализ проводят на трех типах композиций:

- нанокапсулах C24 и A37 примера 1: исследование нанокапсул A37 проводят в двух формах: в форме порошка на лактозном носителе (A37); и

- в форме продукта, обозначенного как Promix, состоящего из масляного раствора витамина Е, адсорбированного на силикагеле (Promix и Promix (2) представляют собой два повторения одного и того же продукта)

Результаты представлены на Фиг. 1.

5 Отмечают, что нанокапсулы ТАС (С24 и А37) позволяют увеличить биодоступность витамина Е относительно продукта Promix, то есть количество содержащегося в кормовой основе витамина Е, солюбилизированного в смешанных мицеллах по окончании расщепления *in vitro*.

Пример 3. Гидролиз ТАС в TOL под действием СЕН в тест-системах *in vitro*

10 Протокол гидролиза витамина Е ацетата (ТАС) под действием СЕН описан в Desmarchelier et al., 2013. Mol. Nutr. Food Res. 2013, 57, 1237-1245.

Кратко, 500 мкл смешанных мицелл, содержащих ТАС, инкубируют в течение 30 минут при 37°C. Затем добавляют СЕН в концентрации 10 ед/мл в течение 30 мин. Затем определяют появление свободного токоферола (TOL) методом ВЭЖХ.

15 Анализы проводят на трех типах композиций:

- нанокапсулах С24 и А37 примера 1; и
- продукта, обозначенного как Е Promix, состоящего из масляного раствора витамина Е.

Результаты представлены на Фиг. 2.

20 Нанокапсулы ТАС (С24 и А37), позволяют увеличить превращение ТАС в TOL относительно продукта Е Promix, что приводит в результате к доступности большего количества витамина Е для абсорбции.

Пример 4: Биодоступность ТАС в тест-системах *in vivo* у крыс

Протокол

25 Анализы проводят на самцах крыс линии Вистар 6-недельного возраста, которые в течение 2 недель получали корм с дефицитом токоферола.

Крыс не кормили за ночь до принудительного кормления.

Крыс (n=10) принудительно кормили в течение 5 дней подряд 5 мг различных растворов ТАС в воде:

- 30
- Microvit<sup>®</sup> Е Promix 50 (витамина Е ацетат, адсорбированный на силикагеле),
  - сухие нанокапсулы С24 примера 1 и
  - сухие нанокапсулы А37 примера 1.

35 Через три часа после последнего принудительного кормления крысам проводили анестезию, собирали кровь путем внутрисердечной пункции и после центрифугирования выделяли плазму крови. После двукратной экстракции гексаном определяли концентрацию альфа-токоферола ( $\alpha$ TOL) в плазме крови методом ВЭЖХ.

Результаты

Результаты представлены на Фиг. 3.

40 В результате принудительного кормления композициями С24 и А37 концентрации  $\alpha$ TOL в плазме крови соответственно составляли 26% и 24% и существенно превышали (Р меньше 0,001) концентрации после принудительного кормления Microvit<sup>®</sup> Е Promix 50.

Пример 5: Биодоступность ТАС в тест-системах *in vivo* у петухов

45 Протокол

Схема эксперимента подробно описана в Prévéraud et al. 2015, British Poultry Science, 56: 2013, 1, 94-102.

Кратко, 60 петухов породы Иза Браун из двух птичников помещают в отдельные

клетки. За неделю до распределения в экспериментальные группы петухов кормят кормом, не содержащим витамин Е.

Петухов (n=10 петухов на группу) принудительно кормили различными растворами ТАС в воде.

Птичник 1: Сухие нанокапсулы С24 примера 1.

ТОЛ и ТАС в форме масла в качестве контроля

Птичник 2: Сухие нанокапсулы С40 примера 1,

ТОЛ и ТАС в форме масла в качестве контроля.

После введения помещенных в капсулу продуктов витамина Е путем принудительного кормления брали образцы крови через 0, 6, 12, 24, 48 и 96 ч после принудительного кормления. После центрифугирования плазму крови сливали и определяли количество несвязанного токоферола методом ВЭЖХ.

Результаты

Результаты проиллюстрированы на Фиг. 4 и 5 и указаны для моментов времени 24 ч и 96 ч в следующих таблицах 3 и 4, где диффузия витамина Е в крови выражена в виде площади под кривой зависимости концентрации от времени (AUC) и процента диффузии относительно ТАС.

Таблица 3

Витамин Е (птичник 1)	24 ч		96 ч	
	AUC мкг/мл/ч	%/ТАС	AUC мкг/мл/ч	%/ТАС
ТАС	206	-	597	-
ТОЛ	307	плюс 49 %	1193	плюс 100 %
С24	228	плюс 11 %	690	плюс 16 %

В результате принудительного кормления композицией С24 концентрации  $\alpha$ ТОЛ в плазме крови существенно выше, чем после принудительного кормления ТАС, не включенным в композицию.

Таблица 4

Витамин Е (птичник 2)	24 ч		96 ч	
	AUC мкг/мл/ч	%/ТАС	AUC мкг/мл/ч	%/ТАС
ТАС	142	-	340	-
ТОЛ	309	плюс 118 %	320	плюс 124 %
С40	146	плюс 3 %	719	плюс 6 %

В результате принудительного кормления композицией С40 концентрации  $\alpha$ ТОЛ в плазме крови существенно не отличались от концентраций после не включенного в композицию контрольного ТАС, и, таким образом, приготовление без неионного ПАВ не обеспечивает потенциал биодоступности.

Пример 6: Биодоступность ТАС в тест-системах in vivo у цыплят

Протокол

Исследуют 1-дневных цыплят, которых кормили в течение 7 дней кормом,

содержащим недостаточное количество токоферола; фиксированная общая продолжительность экспериментальной фазы составляет 15 дней, в течение которых они получают различные препараты витамина Е, смешанные с гранулированным кормом (n=18 на один препарат). Перед этим цыплят размещают группами по 6 штук на клетку. В возрасте 21 день животных подвергают эвтаназии и берут образцы печени. После экстракции определяют количество витамина Е в этой ткани.

Цыплят кормили следующими композициями:

- Microvit<sup>®</sup> Е Promix 50 (витамина Е ацетат, адсорбированный на силикагеле),
- Сухие нанокапсулы C24 примера 1.

После введения помещенных в капсулу продуктов витамина Е путем принудительного кормления брали образцы крови через 0, 6, 12, 24, 48 и 96 ч после принудительного кормления. После центрифугирования плазму крови сливали и определяли количество несвязанного токоферола методом ВЭЖХ.

Результаты

Результаты представлены на Фиг. 6.

В результате принудительного кормления композицией C24 концентрации  $\alpha$ TOL в плазме крови существенно выше, чем после принудительного кормления продуктом E50.

В результате принудительного кормления композицией C24 концентрации  $\alpha$ TOL в печени (плюс 24%) были существенно выше, чем после рациона питания с композицией E50 на основании сравнения углов наклонов вправо кривых доза-ответ.

#### (57) Формула изобретения

1. Коллоидная суспензия нанокапсул для введения активного ингредиента, содержащих по меньшей мере масляную фракцию, включающую или состоящую из жирорастворимого активного ингредиента и ионного поверхностно-активного вещества, и катионный или анионный гидрофильный полимер, окружающий указанную масляную фракцию, причем заряды ионного поверхностно-активного вещества и гидрофильного полимера являются противоположными, и содержание указанного активного ингредиента составляет по меньшей мере 5 мас.% относительно сухой массы нанокапсул.

2. Коллоидная суспензия по п. 1, отличающаяся тем, что нанокапсулы содержат неионное поверхностно-активное вещество.

3. Коллоидная суспензия по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что указанный активный ингредиент выбран из витамина А, витамина D, витамина Е, витамина К и их производных или метаболитов, эфирных масел, жирных кислот, жирных масел и любых их смесей.

4. Коллоидная суспензия по п. 3, отличающаяся тем, что указанный активный ингредиент выбран из эфирных масел тимьяна, душицы, розмарина, чеснока, камелии, горчицы, имбиря, куркумы, винограда, цитрусовых плодов, эспарцета, юкки, полыни, корицы, мяты, гвоздичного дерева, ягод, кумина и эхинацеи.

5. Коллоидная суспензия по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что указанное ионное поверхностно-активное вещество имеет молекулярную массу максимум 1500 г/моль, предпочтительно максимум 1000 г/моль.

6. Коллоидная суспензия по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что ионное поверхностно-активное вещество выбрано из фосфатидилхолинов, таких как яичный лецитин или соевый лецитин, или гексадецилтриметиламмоний бромид.

7. Коллоидная суспензия по любому из пп. 2-6, отличающаяся тем, что указанное неионное поверхностно-активное вещество выбрано из блок-сополимеров

полиоксиэтилен-полиоксипропилен, смесей блок-сополимеров полиоксиэтилен (ПОЭ) -полиоксипропилен (ПОП), Твин-80, сложных эфиров жирных кислот и сахарозы и любой их смеси.

8. Коллоидная суспензия по п. 7, отличающаяся тем, что блок-сополимер(-ы) полиоксиэтилен-полиоксипропилен выбран(-ы) из сополимеров формулы  $POE_x-POP_y-POE_x$ , где x находится в диапазоне от 75 до 85, и y находится в диапазоне от 25 до 35, сополимеров формулы  $POE_x-POP_y-POE_x$ , где x находится в диапазоне от 55 до 65, и y находится в диапазоне от 35 до 45, и сополимеров формулы  $POE_x-POP_y-POE_x$ , где x находится в диапазоне от 112 до 123, и y находится в диапазоне от 40 до 50.

9. Коллоидная суспензия по п. 7, отличающаяся тем, что сложные эфиры жирных кислот и сахарозы выбраны из стеаратов и пальмитатов.

10. Коллоидная суспензия по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что указанный полимер выбран из хитозана, альгината, пектина, крахмала, целлюлозы, казеина и их комбинаций.

11. Коллоидная суспензия по любому из пп. 1-10, отличающаяся тем, что содержание указанного активного ингредиента составляет по меньшей мере 25 мас.% и более предпочтительно по меньшей мере 50 мас.% относительно сухой массы нанокапсул.

12. Коллоидная суспензия по любому из пп. 2-11, отличающаяся тем, что содержание указанного неионного поверхностно-активного вещества составляет по меньшей мере 15 мас.% относительно сухой массы нанокапсул.

13. Нанокапсулы для введения активного ингредиента, содержащие по меньшей мере активный ингредиент в форме масла, одно ионное поверхностно-активное вещество, одно необязательно неионное поверхностно-активное вещество и один катионный или анионный гидрофильный полимер, причем указанные нанокапсулы получены путем высушивания коллоидной суспензии по любому из пп. 1-12.

14. Нанокапсулы по п. 13, адсорбированные на лактозе.

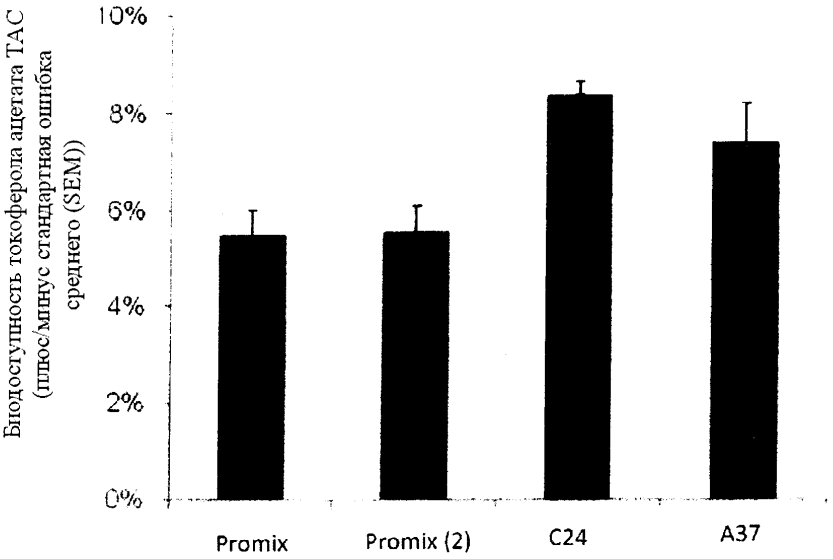
15. Микрочастицы для введения активного ингредиента, содержащие нанокапсулы по п. 13 и лактозу.

16. Применение нанокапсул по п. 13 или микрочастиц по п. 15 в питании животных.

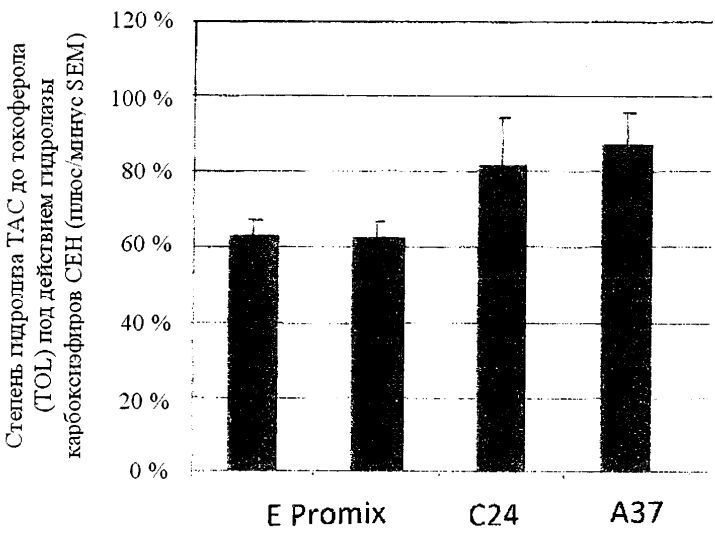
17. Применение по п. 16 для моногастричных животных.

1

Фиг. 1

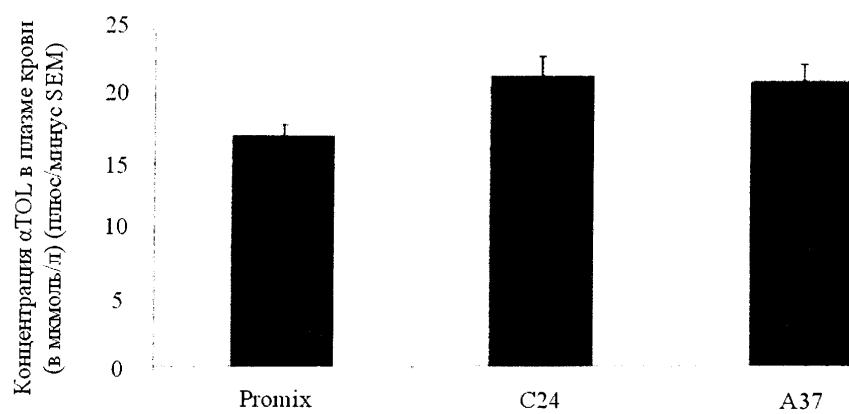


Фиг. 2



2

Фиг. 3

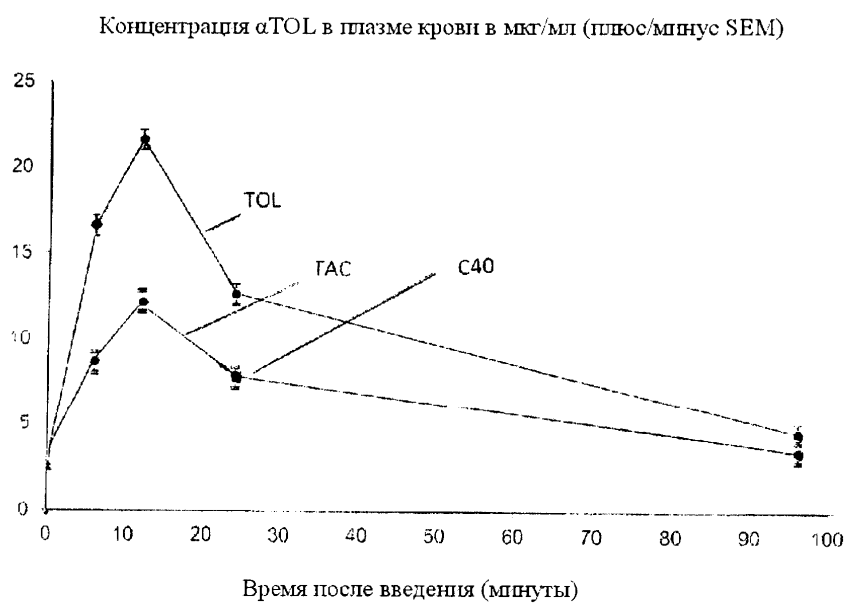




Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6  
Концентрация αTOL в плазме крови (в мкг/мл)

