



УКРАЇНА

(19) **UA**(11) **127243**(13) **C2**

(51) МПК

A23K 40/30 (2016.01)**A61K 9/51** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2018 10156	(72) Винахідник(и):	Превєро Дам'єн (FR), Розільо Веронік (FR)
(22) Дата подання заявки:	17.03.2017	(73) Володілець (володільці):	АДІССЕО ФРАНС С.А.С., 10 place du Général de Gaulle, Antony Parc 2, 92160 Antony, France (FR)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	22.06.2023	(74) Представник:	Кислиця Тетяна Олегівна, реєстр. №425
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	16/52592	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	FR 2924943 A, 19.06.2009 EP 1552820 A1, 13.07.2005 EP 1018363 A1, 12.07.2000 FR 2803203 A1, 06.07.2001 WO 2010040194 A2, 15.04.2010
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	25.03.2016		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	FR		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.12.2018, Бюл.№ 23		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	21.06.2023, Бюл.№ 25		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/FR2017/050622, 17.03.2017		

(54) НАНОКАПСУЛИ ЖИРОРОЗЧИННОГО АКТИВНОГО ІНГРЕДІЄНТА, ЇХ ВИРОБНИЦТВО Й ВИДИ ЗАСТОСУВАННЯ**(57) Реферат:**

Винахід стосується нанокapsул у формі колоїдної суспензії або в сухій формі, які містять щонайменше масляну фракцію, яка включає або складається з жиророзчинного активного інгредієнта та іонної поверхнево-активної речовини, і катіонний або аніонний гідрофільний полімер, який оточує зазначену масляну фракцію, та застосування нанокapsул.

UA 127243 C2

Винахід відноситься до нанокапсул жиророзчинного активного інгредієнта, способу їх виробництва й видів застосування.

У багатьох областях техніки, таких як фармацевтична, косметична й агро-харчова промисловість і, зокрема, в області харчування тварин дуже широко застосовуються такі молекули, як вітаміни, жирні кислоти, ефірні масла. Наприклад, вітаміни А і Е зазвичай застосовуються для виробництва корму, який сприяє росту й здоров'ю тварин.

Гідрофобна природа й вразливість по відношенню до умов навколишнього середовища, зокрема до нагрівання й хімічному впливу в процесі формування їх суміші й зберігання, а також у процесі їх застосування, робить інкапсуляцію молекул необхідною.

Вітамін Е або токоферол (скорочено TOL), який існує переважно у формі α -токоферолу (α TOL), у природному стані являє собою маслянисту, ліпофільну рідину, яка змішується у всіх співвідношеннях, у будь-якій гідрофобній або ліпідній фазі. Він дуже нестабільний, легко окислюється й в окисненому стані втрачає більшу частину своєї біологічної активності. Його біодоступність у тварин не перевищує 50 % при пероральному прийомі, оскільки, швидко окиснюючись, він, головним чином, абсорбується в окисненій неактивній формі. Крім того, при пероральному прийомі вітамін Е знаходиться у формі більш стабільного похідного, зазвичай вибраного зі складних ефірів, наприклад, ацетату, і солей вітаміну Е.

Вітамін А існує в декількох формах, зокрема у вигляді складного ефіру, і знаходиться в одній з найбільш стабільних форм — у формі ретинолу ацетату, яка найчастіше споживається домашньою худобою (птицею, свинями й великою рогатою худобою). Однак його чутливість до окиснення, температури, світла, кислот зберігається. Таким чином, при застосуванні у фармацевтичній області або в харчуванні тварин він дуже швидко розкладається, як тільки попадає під дію перших жорстких умов, зокрема кислого середовища, травної системи, у результаті чого біодоступна форма вітаміну А не утворюється.

Давно відомо, що з метою кращого збереження цих чутливих активних інгредієнтів їх можна захистити за допомогою покриття або інкапсуляції. Для інкапсуляції вітамінів, зокрема вітамінів А і Е, розроблені й широко застосовуються різні засоби, такі як засоби, які включають білки.

Однак автори винаходу все ще знаходяться у пошуках композиції жиророзчинного активного інгредієнта, який мав би високу біодоступність.

Автори винаходу шукали нову композицію таких активних інгредієнтів, здатну підвищувати їхню абсорбцію, зокрема абсорбцію в кишечнику.

Оскільки більшість цих активних інгредієнтів зазвичай застосовують у захищеній формі, ще більш суттєвою була розробка композиції, яка дозволяє зазначеним активним інгредієнтам абсорбуватися в їхній вільній активній формі, що означає, що гідроліз захищеної форми і її абсорбція повинні відбуватися майже одночасно.

Авторами винаходу вперше виявлено, що такі активні інгредієнти можна включати в нанокапсули з високим вмістом зазначених активних інгредієнтів, і це можна здійснювати чистим способом у тому розумінні, що в ньому не використовують ніяких органічних розчинників. Згодом автори винаходу розробили нанокапсули, здатні ефективним чином вивільняти активну форму активного інгредієнта, а саме форму, яка задовольняє всім описаним вище вимогам.

Таким чином, винахід відноситься до композиції з високим вмістом жиророзчинного(-их) активного(-их) інгредієнта(-ів) у формі нанокапсул, який у переважному варіанті здійснення має підвищену біодоступність в порівнянні з композиціями, представленими в цей час на ринку.

Винахід додатково націлений на здійснення промислово придатного й екологічно нешкідливого способу одержання таких нанокапсул. Крім того, розроблений авторами винаходу спосіб призводить до одержання нанокапсул, які мають низьку залишкову вологовмісткість, переважно менше 8 %, що забезпечує їхню стабільність з часом незалежно від умов зберігання.

Залежно від області застосування активного інгредієнта нанокапсули за винаходом можуть здійснюватися у формі для більш простого поводження, наприклад, у формі мікрочастинок, зокрема, шляхом адсорбції зазначених нанокапсул на носіях. У наступному описі термін "частинка" буде закріплений за будь-якою формою зазначених наночастинок, і як приклад такі частинки є мікрочастинками, які містять нанокапсули за винаходом. Таким чином, якщо активний інгредієнт призначений для харчування тварин, особливо переважним є нанокапсули, включені в сухі частинки, які характеризуються відмінною зміщуваністю для їхнього включення в премікс. При даному показанні до застосування такі частинки являють собою мікрочастинки, середній розмір яких складає менше 300 мкм.

Тепер різні об'єкти винаходу будуть описані більш докладно.

Далі винахід описаний більш конкретно відносно вітаміну Е, але очевидно, що його обсяг не обмежений ним, і винахід може бути застосований до будь-якого жиророзчинного активного інгредієнта й будь-якої суміші таких речовин.

5 Як зазначено вище, винахід відноситься до наночастинок, які містять щонайменше один жиророзчинний інгредієнт у високій концентрації, який є стабільним і може мати високу біодоступність. Наночастинки за винаходом можуть знаходитися у формі колоїдної суспензії або в сухій формі після висушування цієї суспензії.

10 Як у формі колоїдної суспензії, так і в сухій формі зазначені нанокапсули містять щонайменше одну масляну фракцію, яка включає або складається з жиророзчинного інгредієнта й іонної поверхнево-активної речовини (ПАР), і один переважно гідрофільний полімер, який оточує зазначену масляну фракцію.

15 Автори винаходу неочікувано виявили, що для того, щоб зробити вітамін Е біодоступним або щонайменше підвищити його біодоступність, нанокапсули повинні додатково містити щонайменше одну неіонну поверхнево-активну речовину. Зрозуміло, залежно від показань до застосування активного інгредієнта ця біодоступність може бути небажаною або навіть неприпустимою, і в цьому випадку нанокапсули не будуть містити неіонну ПАР.

Як вже згадувалося, нанокапсули за винаходом дозволяють переносити будь-який жиророзчинний активний інгредієнт. Таким чином, цей інгредієнт може бути вибраний з:

20 жиророзчинних вітамінів, таких як вітаміни А, D, Е, К, їх похідних, зокрема складних ефірів, наприклад ацетату, пропіонату або сукцинату, а також їх метаболітів, таких як ретиналь, ретиноєва кислота, 25-гідроксихолекальциферол, 1,25-

дигідроксихолекальциферол;

каротиноїдів;

25 ефірних масел, таких як ефірні масла чебрецю, материнки, розмарину, часнику, камелії, гірчиці, імбиру, куркуми, винограду, цитрусових плодів, еспарцету, юки, полині, кориці, м'яти, гвоздичного дерева, ягід, кумину й ехінацеї;

насичених, моновенасичених і поліненасичених жирних кислот;

жирних масел.

30 Якщо активний інгредієнт є рідиною або, ймовірно, стає рідким при нагріванні, він може складатися із власної масляної фази, у якій буде присутня іонна поверхнево-активна речовина.

Якщо активний інгредієнт знаходиться не в рідкому стані при температурі одержання нанокапсул, то його можна попередньо солюбілізувати у маслі, як правило, в інертному маслі, яке буде використовуватися як носій. Як приклад це масло може являти собою триолеїн.

35 Перевага нанокапсул за винаходом полягає в тому, що вміст у них активного інгредієнта може знаходитися в діапазоні від мінімум, наприклад, 5 мас. % до більше 50 мас. % або навіть щонайменше 90 мас. % відносно сухої маси нанокапсул. Цей вміст визначається залежно від призначення нанокапсул і, як правило, складає щонайменше 5 мас. %, переважно щонайменше 25 мас. % і більш переважно щонайменше 50 мас. % або навіть щонайменше 70 мас. %, навіть щонайменше 90 мас. % відносно сухої маси нанокапсул.

40 Зазначена іонна поверхнево-активна речовина переважно вибрана з ПАР, молекулярна маса яких складає максимум 1500 г/моль або навіть максимум 1000 г/моль. Вище 1500 г/моль нанокапсули формуються із труднощами. Серед цих переважних поверхнево-активних речовин можуть бути фосфатидилхоліни, такі як яєчний лецитин або соєвий лецитин, або гексадецилтриметиламонію бромід. Позитивно або негативно заряджена іонна поверхнево-активна речовина вибрана так, щоб її заряд був протилежний заряду полімеру.

45 Зазначена неіонна поверхнево-активна речовина переважно вибрана із блок-співполімерів поліоксиетилен-поліоксипропілен, сумішей блок-співполімерів поліоксиетилен (ПОЕ)-поліоксипропілен (ПОП), Твін-80, складних ефірів жирних кислот і сахарози й, зокрема пальмітатів і стеаратів, і будь-яких їх сумішей. У рамках цього визначення переважні поверхнево-активні речовини вибрані зі співполімерів формули $\text{ПОЕ}_x\text{-ПОП}_y\text{-ПОЕ}_x$, де x знаходиться в діапазоні від 75 до 85, і y знаходиться в діапазоні від 25 до 35, співполімерів формули $\text{ПОЕ}_x\text{-ПОП}_y\text{-ПОЕ}_x$, де x знаходиться в діапазоні від 55 до 65, і y знаходиться в діапазоні від 35 до 45, і співполімерів формули $\text{ПОЕ}_x\text{-ПОП}_y\text{-ПОЕ}_x$, де x знаходиться в діапазоні від 112 до 123, і y знаходиться в діапазоні від 40 до 50, а також складних ефірів жирних кислот і сахарози, наявних у продажі під торговельними марками SISTERNA® SP70 і PS750.

55 Полімер(-и), що дозволяє(-ють) одержати нанокапсули відповідно до винаходу, вибраний(-і) з катіонних або аніонних полімерів, де заряд полімеру протилежний заряду іонної поверхнево-активної речовини. Переважно це полімери природного походження, таким чином, переважно це один або більше полімерів вибраних з хітозану, альгілату, пектину, крохмалю, целюлози,

казеїну і їх комбінацій. Таким чином, переважні комбінації полімеру й іонної ПАР складаються з хітозану і яєчного лецитину й альгінату й цетилтриметиламонію броміду (ЦТАБ).

Відповідно до переважного варіанта здійснення винаходу вміст у суспензії неіонної ПАР, як визначено вище, складає щонайменше 15 мас. % відносно сухої маси нанокапсул.

5 Інший об'єкт винаходу складається з нанокапсул, отриманих у результаті висушування описаної вище колоїдної суспензії. Ці нанокапсули, таким чином, містять щонайменше масляну фракцію, яка включає або складається з жиророзчинного активного інгредієнта, іонної поверхнево-активної речовини, необов'язково неіонної поверхнево-активної речовини й полімеру, переважно гідрофільного полімеру, причому зазначені нанокапсули отримані шляхом висушування колоїдної суспензії за винаходом. Висушування переважно здійснюють у присутності лактози, причому нанокапсули за винаходом адсорбують на лактозі.

10 У винаході також запропоновані частинки, які містять нанокапсули, як ті, що описані вище, які адсорбовані на носії. Носій може бути вибраний з будь-якого інертного носія, такого як, наприклад, лактоза. У переважному варіанті здійснення ці частинки являють собою мікрочастинки, які містять нанокапсули за винаходом, адсорбовані на лактозі.

15 Спосіб за винаходом для одержання нанокапсул, як у вигляді колоїдної суспензії, описаної вище, так і в сухому стані після обробки такої суспензії, є ще одним об'єктом винаходу.

Таким чином, спосіб одержання колоїдної суспензії нанокапсул включає наступні стадії:

20 Наявність, з одного боку, першої фази, що містить щонайменше масляну фракцію, яка включає або складається із щонайменше жиророзчинного активного інгредієнта й іонної поверхнево-активної речовини, і, з іншого боку, другої водної фази, що містить щонайменше полімер і необов'язково неіонну поверхнево-активну речовину, де молярна концентрація зазначеної іонної ПАР й однієї з неіонних ПАР, якщо доцільно, більше або дорівнює 100-кратній критичній концентрації міцелоутворення (ККМ) зазначеної(-их) іонної(-их) ПАР й зазначеної(-их) неіонної(-их) ПАР відповідно; при цьому активний(-і) інгредієнт(-и), іонні поверхнево-активні речовини, неіонні поверхнево-активні речовини й полімери відповідають наведеним вище визначенням;

Формування грубозернистої емульсії, яку згодом гомогенізують під високим тиском для утворення колоїдної суспензії нанокапсул.

30 Визначення ККМ може бути виконано будь-яким методом, добре відомим фахівцям у даній області техніки, наприклад, шляхом вимірювання поверхневого натягу за допомогою тензіометра методом пластини або кільця.

35 Якщо активний(-ні) інгредієнт(-и) знаходиться (-ються) не в рідкому стані при кімнатній температурі або має(-ють) занадто велику в'язкість, масляну й водну фази доводять до температури в діапазоні від 60 до 70 °C, дозволяючи активному(-им) інгредієнту(-ам) розплавитися.

Емульсію, яка називається грубозернистою емульсією, одержують шляхом простого перемішування водної й масляної фаз. Після цього проводять її гомогенізацію під високим тиском, наприклад, протягом щонайменше 6 хвилин при тиску, щонайменше рівному 600 бар.

40 Щоб одержати сухі нанокапсули за винаходом з колоїдної суспензії нанокапсул, як описано вище, зазначені нанокапсули висушують розпиленням у присутності лактози. Цим способом одержують суспензії, які не є липкими й можуть зберігатися при кімнатній температурі.

45 Винахід також відноситься до видів застосування таких нанокапсул. Вони становлять великий інтерес у харчуванні тварин, зокрема, моногастричних тварин. При даному показанні до застосування їх використовують у формі частинок, і зокрема у формі мікрочастинок, як описано вище.

Винахід проілюстровано, і його переваги висвітлені в наведених нижче прикладах, які показують одержання нанокапсул альфа-токоферолу ацетату (αTAC) і їх характеристик у харчуванні тварин у тест-системах *in vitro* та *in vivo*.

50 На Фіг. 1 показана біодоступність *in vitro* TAC для різних композицій TAC.

На Фіг. 2 показана ступінь гідролізу *in vitro* TAC в TOL для різних композицій TAC.

На Фіг. 3 показана концентрація (αTOL у плазмі (у мкмоль/л) у пацюків після введення різних композицій TAC шляхом примусового годування.

55 На Фіг. 4 показана концентрація (αTOL у плазмі (у мкг/мл) у півнів після введення різних композицій TAC шляхом примусового годування.

На Фіг. 6 показана концентрація (αTOL у плазмі (у мкг/мл) у курчат після введення різних композицій TAC у складі корму.

У наведених нижче прикладах проведений аналіз різних показників і, зокрема, біодоступності вітаміну E.

Біодоступність жиророзчинного активного інгредієнта, такого як вітамін Е або похідна вітаміну Е, виражена у вигляді концентрації вітаміну Е, який вивільняється в кров, відносно концентрації вітаміну Е, присутнього в раціоні тварини, або відносно концентрації, вираженої у вигляді еквівалента вітаміну Е похідного вітаміну Е, введеного в раціон харчування тварини, у випадку введення похідного вітаміну. При такому представленні біодоступності вітаміну Е, таким чином, ураховують абсорбцію вітаміну Е або похідного вітаміну Е у кишечнику під час проходження через травний тракт.

Приклад 1: Одержання нанокапсул відповідно до винаходу

Композиція

Нанокапсули, отримані в даному прикладі, позначені індексами C24, A37 і C40.

Їх одержують із колоїдної суспензії, яка містить щонайменше:

ТАС

іонну поверхнево-активну речовину, вибрану з яєчного лецитину (Lipoid E80) і гексадецилтриметиламонію броміду (ЦТАБ),

для нанокапсул C24 і A37 неіонну поверхнево-активну речовину Lutrol®-F68,

щонайменше один іонний гідрофільний полімер, вибраний з (катионного) хітозану й (аніонного) альгінату натрію,

причому зазначену колоїдну суспензію згодом висушують у присутності лактози. Композиція цих наночастинок показана в наступній таблиці 1, де вміст інгредієнтів виражений у вигляді мас. % (мас/мас, сухої речовини):

Таблиця 1

Частинки		C24	A37	C40
Активний інгредієнт	ТАС	24	37	39
Іонна ПАР	Lipoid E80	12	-	10
	ЦТАБ	-	4,5	-
Неіонна ПАР	Lutrol®-F68	15	23	-
Полімер	Хітозан	13	-	10
	Альгінат натрію	-	8,1	
Носій	Лактоза	36	27,4	41

Одержання

Спосіб одержання наночастинок має 3 наступні стадії:

одержання наноемульсії;

одержання колоїдної суспензії нанокапсул; і

висушування нанокапсул.

Протокол одержання нанокапсул C24 і A37:

Одержання наноемульсії:

Для нанокапсул C24:

іонну поверхнево-активну речовину Lipoid E80 диспергують в ТАС при перемішуванні за допомогою турбіни, і температуру дисперсії доводять до 65 °С, щоб одержати масляну фазу, неіонну поверхнево-активну речовину (Lutrol® F68) розчиняють у воді й доводять температуру розчину до 65 °С, щоб одержати водну фазу.

Для нанокапсул A37:

температуру ТАС, який складає масляну фазу, доводять до 65 °С, і диспергують у ньому іонну поверхнево-активну речовину ЦТАБ,

неіонну поверхнево-активну речовину (Lutrol® F68) розчиняють у воді й доводять температуру розчину до 65 °С, щоб одержати водну фазу,

потім для нанокапсул C24 і A37:

водну фазу додають до масляної фази при перемішуванні й формують первинну або грубозернисту емульсію за допомогою турбіни Reupner при 600 об./хв при 65 °С протягом 15 хвилин,

емульсію переносять у гомогенізатор високого тиску й гомогенізують при тиску 600 бар протягом 6 хвилин при 65 °С, щоб одержати наноемульсію.

Одержання колоїдної суспензії нанокапсул:

наноемульсію, отриману вище, розбавляють 1:10 розчином Lutrol® F68,

додають оцтовий розчин хітозану в концентрації 0,05 г/л для нанокапсул C24 або додають розчин альгінату натрію в концентрації 1,8 г/л для нанокапсул A37 при перемішуванні за

допомогою турбіни протягом 2 годин при кімнатній температурі для одержання колоїдної суспензії нанокapsул за винаходом.

Висушування нанокapsул:

нанокapsули висушують розпилювальним сушінням на лактозі; параметри являють собою:
5 витрати насоса 15 %, температура на вході 150 °C, швидкість потоку 7 мл/хв і швидкість потоку стисненого повітря 500 л/год.

Протокол одержання нанокapsул C40:

Нанокapsули C40 одержують описаним вище способом для нанокapsул C24 за винятком того, що неіонну поверхнево-активну речовину не додають.

10 Визначення характеристик нанокapsул:

Нанокapsули характеризують за розміром, зазначеному в наведеній нижче таблиці 2, на двох стадіях способу одержання, на першій - при формуванні наноемульсії до додавання полімеру й на другій - в кінці способу до висушування нанокapsул:

Таблиця 2

Наночастинки	C24	A37	C40
Розмір нанокapsель до додавання полімеру (нм)	219	236	123
Розмір нанокapsули до висушування (нм)	355	342	163

15 У наступних прикладах перевага композицій TAC відповідно до винаходу проілюстрована на підставі оцінки біодоступності TAC.

Біодоступність TAC з композиції відповідає частці TOL, яка абсорбується слизовою оболонкою кишечника, яка буде використана для метаболізму клітин і функціонування органів.
20 Ця біодоступність є комбінацією різних факторів і, зокрема, біодоступності TAC, тобто присутньої в композиції частки вітаміну E (у формі TAC), солюбілізованого в змішаних міцелах, і гідролізу TAC в TOL гідролазою карбоксиефірів (СЕН), яка секретується у травній системі.

Приклад 2: Біодоступність TAC у композиціях TAC, яка оцінюється в тест-системах in vitro

25 Це дослідження описано в Desmarchelier et al., 2013. Moï. Nutr. Food Res. 2013, 57, 1237-1245.

У цих тест-системах in vitro готують змішані міцели, які містять різні композиції TAC прикладу 1, що дозволяє відтворювати умови розщеплення шляхом моделювання міцел, задіяних у кишечнику.

30 Біодоступність вітаміну E розраховують після розщеплення in vitro корму, який містить різні композиції. Її визначають на підставі співвідношення вітаміну E, визначеного методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), що знаходиться в міцелярній фазі, і вітаміну E, певного методом ВЕРХ, присутнього в дігестаті, отриманого в кінці дуоденальної фази.

Аналізи проводять на трьох типах композицій:

35 у нанокapsулах C24 і A37 прикладу 1: дослідження нанокapsул A37 проводять у двох формах: у формі порошку на лактозному носії (A37); і

у формі продукту, позначеного як Promix, який складається з масляного розчину вітаміну E, адсорбованого на силікагелі (Promix і Promix (2) являють собою два повторення того самого продукту)

Результати представлені на Фіг. 1.

40 Відзначають, що нанокapsули TAC (C24 і A37) дозволяють збільшити біодоступність вітаміну E відносно продукту Promix, тобто кількість вітаміну E, який міститься в кормовій основі, солюбілізованого в змішаних міцелах по закінченню розщеплення in vitro.

Приклад 3. Гідроліз TAC в TOL під дією СЕН у тест-системах in vitro

45 Протокол гідролізу вітаміну E ацетату (TAC) під дією СЕН описаний в Desmarchelier et al., 2013. Moï. Nutr. Food Res. 2013, 57, 1237-1245.

Коротко, 500 мкл змішаних міцел, які містять TAC, інкубують протягом 30 хвилин при 37 °C. Потім додають СЕН у концентрації 10 од/мл протягом 30 хв. Потім визначають виникнення вільного токоферолу (TOL) методом ВЕРХ.

Аналізи проводять на трьох типах композицій:

50 у нанокapsулах C24 і A37 прикладу 1; і

продукту, позначеного як E Promix, який складається з масляного розчину вітаміну E.

Результати представлені на Фіг. 2.

55 Нанокapsули TAC (C24 і A37), дозволяють збільшити перетворення TAC в TOL відносно продукту E Promix, що призводить у результаті до доступності більшої кількості вітаміну E для абсорбції.

Приклад 4: Біодоступність ТАС у тест-системах in vivo у пацюків

Протокол

Аналізи проводять на самцях пацюків лінії Вістар 6-тижневого віку, які протягом 2 тижнів одержували корм з дефіцитом токоферолу.

5 Пацюків не годували за ніч до примусового годування.

Пацюків (n=10) примусово годували протягом 5 днів підряд 5 мг різних розчинів ТАС у воді:

Microvit® E Promix 50 (вітаміну Е ацетат, адсорбований на силікагелі),

сухі нанокапсули С24 прикладу 1 і

сухі нанокапсули А37 прикладу 1.

10 Через три години після останнього примусового годування пацюкам проводили анестезію, збирали кров шляхом внутрішньосерцевої пункції й після центрифугування виділяли плазму крові. Після дворазової екстракції гексаном визначали концентрацію альфа-токоферолу (α TOL) у плазмі крові методом ВЕРХ.

Результати

15 Результати представлені на Фіг. 3.

У результаті примусового годування композиціями С24 і А37 концентрації α TOL у плазмі крові відповідно складали 26 % і 24 % і суттєво перевищували (Р менше 0,001) концентрації після примусового годування Microvit® E Promix 50.

Приклад 5: Біодоступність ТАС у тест-системах in vivo у півнів

20 Протокол

Схема експерименту докладно описана в Preveraud et al. 2015, British Poultry Science, 56:2013, 1, 94-102.

Коротко, 60 півнів породи Іза Браун із двох пташників поміщають в окремі клітки. За тиждень до розподілу в експериментальні групи півнів годують кормом, який не містить вітамін Е.

25 Півнів (n=10 півнів на групу) примусово годували різними розчинами ТАС у воді.

Пташник 1: Сухі нанокапсули С24 прикладу 1.

TOL і ТАС у формі масла як контроль

Пташник 2: Сухі нанокапсули С40 прикладу 1,

TOL і ТАС у формі масла як контроль.

30 Після введення поміщених у капсулу продуктів вітаміну Е шляхом примусового годування брали зразки крові через 0, 6, 12, 24, 48 і 96 год. після примусового годування.

Після центрифугування плазму крові зливали й визначали кількість незв'язаного токоферолу методом ВЕРХ.

Результати

35 Результати проілюстровані на Фіг. 4 і 5 і зазначені для моментів часу 24 год. і 96 год. у наступних таблицях 3 і 4, де дифузія вітаміну Е у крові виражена у вигляді площі під кривою залежності концентрації від часу (AUC) і відсотка дифузії відносно ТАС.

Таблиця 3

Вітамін Е (пташник 1)	24 год.		96 год.	
	AUC мкг/мл/год.	%/ТАС	AUC мкг/мл/год.	%/ТАС
ТАС	206	-	597	-
TOL	307	плюс 49 %	1193	плюс 100 %
C24	228	плюс 11 %	690	плюс 16 %

40 У результаті примусового годування композицією С24 концентрації α TOL у плазмі крові суттєво вище, чим після примусового годування ТАС, не включеним у композицію.

Таблиця 4

Вітамін Е (пташник 2)	24 год.		96 год.	
	AUC мкг/мл/год.	%/ТАС	AUC мкг/мл/год.	%/ТАС
ТАС	142	-	340	-
TOL	309	плюс 118 %	320	плюс 124 %
C40	146	плюс 3 %	719	плюс 6 %

45 У результаті примусового годування композицією С40 концентрації α TOL у плазмі крові суттєво не відрізнялися від концентрацій після не включеного в композицію контрольного ТАС, і, таким чином, приготування без неіонної ПАР не забезпечує потенціал біодоступності.

Приклад 6: Біодоступність ТАС у тест-системах in vivo у курчат
Протокол

Досліджують 1-денних курчат, яких годували протягом 7 днів кормом, що містить недостатню кількість токоферолу; фіксована загальна тривалість експериментальної фази складає 15 днів, протягом яких вони одержують різні препарати вітаміну Е, змішані з гранульованим кормом (n=18 на один препарат). Перед цим курчат розміщують групами по 6 штук на клітку. У віці 21 день тварин піддають евтаназії й беруть зразки печінки. Після екстракції визначають кількість вітаміну Е у цій тканині.

Курчат годували наступними композиціями:

Microvit® E Promix 50 (вітаміну Е ацетат, адсорбований на силікагелі),
Сухі нанокапсули C24 прикладу 1.

Після введення поміщених у капсулу продуктів вітаміну Е шляхом примусового годування брали зразки крові через 0, 6, 12, 24, 48 і 96 год. після примусового годування. Після центрифугування плазму крові зливали й визначали кількість незв'язаного токоферолу методом ВЕРХ.

Результати

Результати представлені на Фіг. 6.

У результаті примусового годування композицією C24 концентрації α TOL у плазмі крові суттєво вище, чим після примусового годування продуктом E50.

У результаті примусового годування композицією C24 концентрації α TOL у печінці (плюс 24 %) були суттєво вище, чим після раціону харчування з композицією E50 на основі порівняння кутів нахилів вправо кривих доза-відповідь.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Колоїдна суспензія нанокапсул, що містять щонайменше масляну фракцію, яка включає або складається з жиророзчинного активного інгредієнта та іонної поверхнево-активної речовини, і катіонний або аніонний гідрофільний полімер, який оточує зазначену масляну фракцію, де заряд іонної поверхнево-активної речовини і заряд одного гідрофільного полімеру є протилежними і

зазначений активний інгредієнт вибраний з вітаміну А, вітаміну D, вітаміну Е, вітаміну К і їх похідних або метаболітів, ефірних олій, жирних кислот, жирних масел і будь-яких їх сумішей та вміст зазначеного активного інгредієнта складає щонайменше 5 мас. % відносно сухої маси нанокапсул.

2. Колоїдна суспензія за п. 1, яка **відрізняється** тим, що нанокапсули містять неіонну поверхнево-активну речовину.

3. Колоїдна суспензія за п. 1, яка **відрізняється** тим, що зазначений активний інгредієнт вибраний з ефірних олій чебрецю, материнки, розмарину, часнику, камелії, гірчиці, імбиру, куркуми, винограду, цитрусових плодів, еспарцету, юки, полину, кориці, м'яти, гвоздичного дерева, ягід, кумину й ехінацеї.

4. Колоїдна суспензія за будь-яким із пп. 1-3, яка **відрізняється** тим, що зазначена іонна поверхнево-активна речовина має молекулярну масу максимум 1500 г/моль.

5. Колоїдна суспензія за будь-яким із пп. 1-4, яка **відрізняється** тим, що іонна поверхнево-активна речовина вибрана з фосфатидилхолінів, таких як яєчний лецитин або соєвий лецитин, або гексадецилтриметиламонію броміду.

6. Колоїдна суспензія за будь-яким із пп. 2-5, яка **відрізняється** тим, що зазначена неіонна поверхнево-активна речовина вибрана із блок-співполімерів поліоксіетилен-поліоксипропілен, сумішей блок-співполімерів поліоксіетилен-поліоксипропілен, Твін-80, складних ефірів жирних кислот і сахарози й будь-яких їх сумішей.

7. Колоїдна суспензія за п. 6, яка **відрізняється** тим, що блок-співполімер(и) поліоксіетилен-поліоксипропілен вибраний(і) зі співполімерів формули $\text{ПОЕ}_x\text{-ПОПУ-ПОЕ}_x$, де x знаходиться в діапазоні від 75 до 85 і у знаходиться в діапазоні від 25 до 35, співполімерів формули $\text{ПОЕ}_x\text{-ПОПУ-ПОЕ}_x$, де x знаходиться в діапазоні від 55 до 65 і у знаходиться в діапазоні від 35 до 45, і співполімерів формули $\text{ПОЕ}_x\text{-ПОПУ-ПОЕ}_x$, де x знаходиться в діапазоні від 112 до 123 і у знаходиться в діапазоні від 40 до 50.

8. Колоїдна суспензія за п. 6, яка **відрізняється** тим, що складні ефіри жирних кислот і сахарози вибрані зі стеаратів і пальмітатів.

9. Колоїдна суспензія за будь-яким із пп. 1-8, яка **відрізняється** тим, що зазначений полімер вибраний з хітозану, альгінату, пектину, крохмалю, целюлози, казеїну і їх комбінацій.

10. Колоїдна суспензія за будь-яким із пп. 1-9, яка **відрізняється** тим, що вміст зазначеного активного інгредієнта складає щонайменше 25 мас. % і більш переважно щонайменше 50 мас. % відносно сухої маси нанокапсул.

11. Колоїдна суспензія за будь-яким із пп. 2-10, яка **відрізняється** тим, що вміст зазначеної неіонної поверхнево-активної речовини складає щонайменше 15 мас. % відносно сухої маси нанокапсул.

12. Нанокапсули, які містять щонайменше активний інгредієнт у формі масла, що вибраний з вітаміну А, вітаміну D, вітаміну Е, вітаміну К і їх похідних або метаболітів, ефірних олій, жирних кислот, жирних масел і будь-яких їх сумішей, одну іонну поверхнево-активну речовину та один катіонний або аніонний гідрофільний полімер, причому зазначені нанокапсули отримані шляхом висушування колоїдної суспензії за будь-яким із пп. 1-11.

13. Нанокапсули за п. 12, адсорбовані на лактозі.

14. Мікрочастинки, які містять нанокапсули за п. 12 і лактозу.

15. Застосування нанокапсул за п. 12 або мікрочастинок за п. 14 у харчуванні тварин.

16. Застосування за п. 15 для моногастричних тварин.

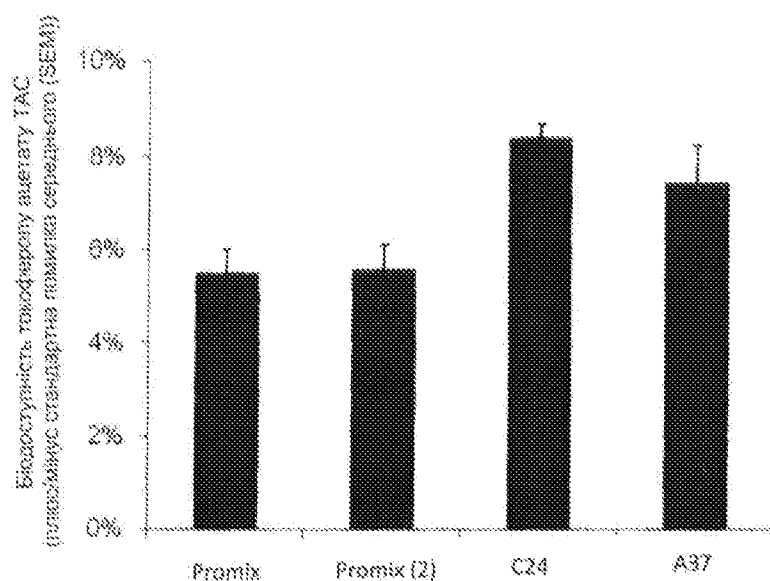


Fig. 1

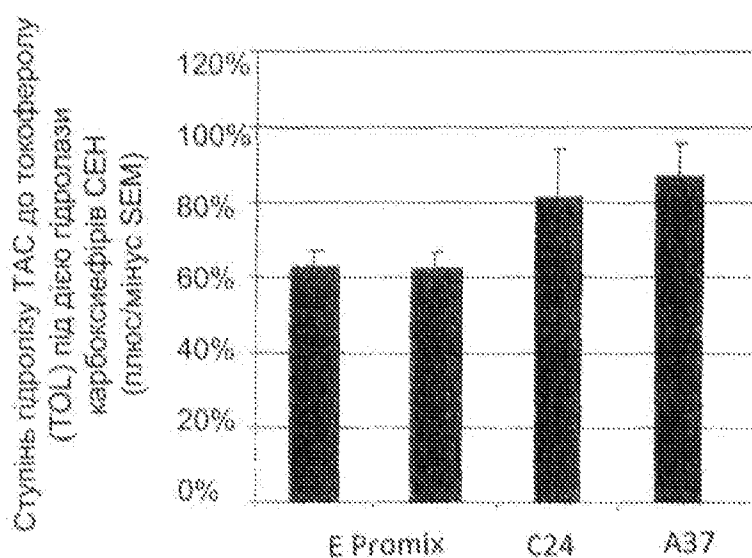
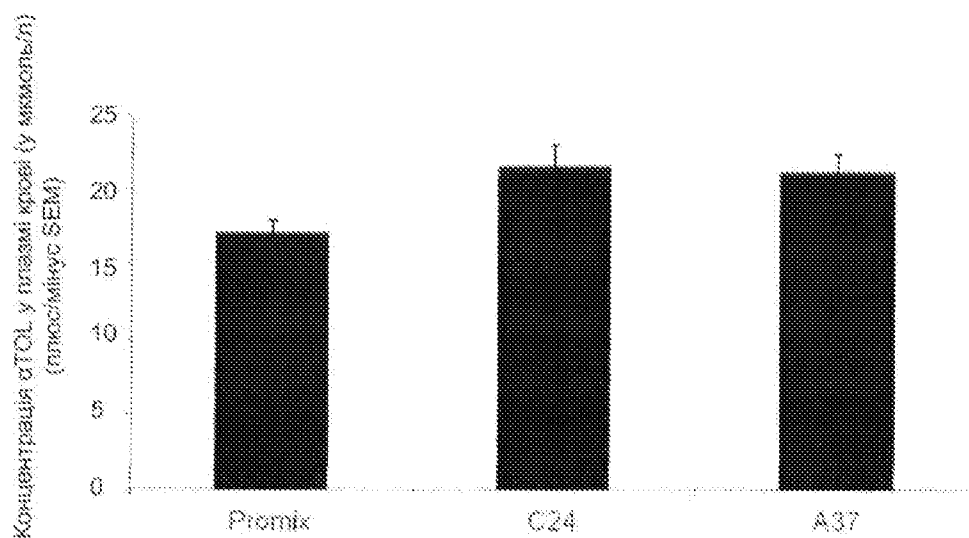
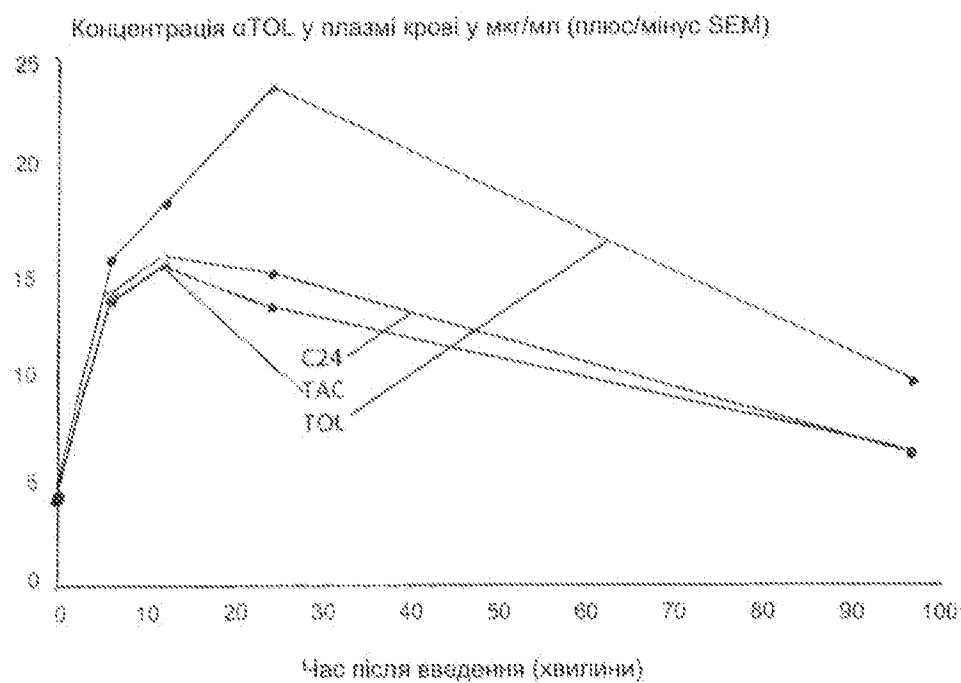


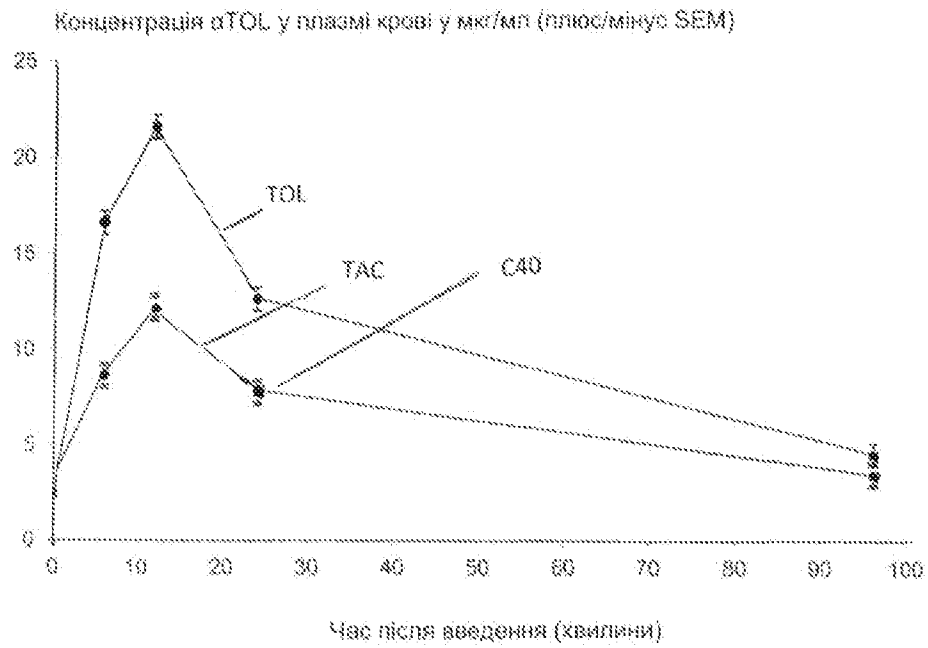
Fig. 2



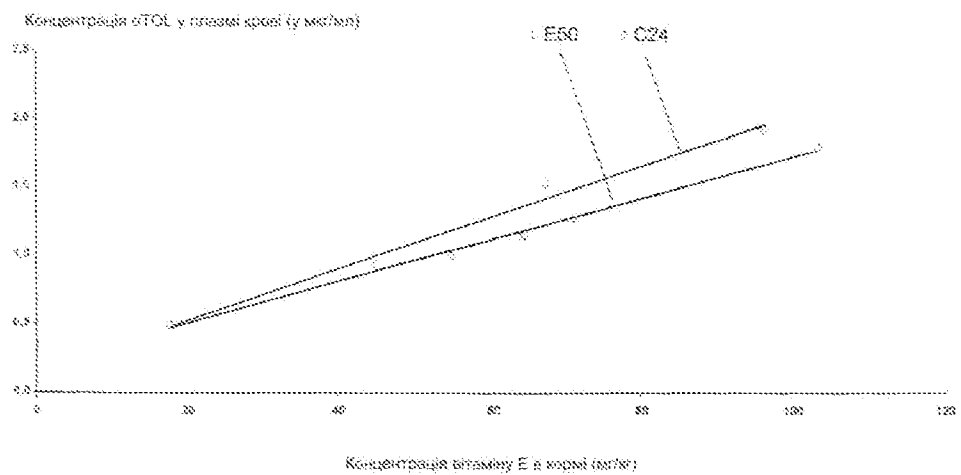
Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6