

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к технологии получения лекарственных средств из морских гидробионтов. а получаемые продукты могут использоваться в качестве препаратов при лечении легочных и гормональных патологий.

Прототипом изобретения является способ получения комплекса фосфолипидов, обладающего свойствами сурфактанта, который включает на первом этапе выделение поверхностно-активных веществ (ПАВ) путем экстракции измельченных гонад кальмаров спиртом, удаления примесей смесью 10%-ного раствора гидрокарбоната натрия

с гексаном и упаривание гексана в вакууме, а затем на втором этапе суспендирование полученных ПАВ в смеси гепарина и физраствора в соотношении ПАВ:физраствор:гепарин 10:1:(1-1,5) до получения липосомального препарата.

Несмотря на достаточно высокий выход биологических ПАВ из гонад кальмаров - до 5%, способ-прототип не лишен ряда недостатков:

- нерациональное использование сырья - получение одного препарата из источника, характеризующегося содержанием широкого спектра биологически активных компонентов;
- получаемый сурфактантный препарат нестабилен из-за окисления липидных компонентов, в частности, жирных кислот, фосфолипидов;
- снижение сурфактантной активности ПАВ при лечении из-за введения в препарат гепарина, отрицательно влияющего на сурфактантный статус легких.

Предложенное изобретение решает задачу безотходного использования сырья - гонады кальмаров - для дифференцированного выделения одновременно двух продуктов с высокими показателями стабильности: одного, содержащего фосфолипидный комплекс и другого, содержащего тестостероно-генные вещества.

Предложенная схема получения состоит из трех этапов, причем первый этап является подготовительным для выделения целевых препаратов на последующих двух этапах, проводимых параллельно и одновременно.

Этап 1: измельчение сырья, экстракция липидов этанолом, удаление этанола, перерастворение в гексане, отстаивание на холоду до получения супернатанта и осадка.

Этап 2а: из супернатанта упаривают гексан, перерастворяют в этаноле, очищают активированным углем, выделяют ПАВ, в который добавляют витамин Е и получают конечный продукт, преимущественно в виде комплекса фосфолипидов, обладающего высокими поверхностно-активными свойствами.

Этап 2б (проводят параллельно с этапом 2а): осадок, получаемый при отстаивании на холоду, после удаления супернатанта, переосаждают смесью этанола с эфиром, разделяют на две фазы: твердую и жидкую, жидкость упаривают в вакууме, перерастворяют в этаноле, очищают активированным углем, проводят ультрафильтрацию и получают конечный продукт в виде тестостероногенного вещества - комплекс нуклеопептид-липидов.

Неожиданным при разработке нового способа является использование получаемого при отстаивании на холоду осадка, из которого после проведения предложенных операций обработки и очистки выделяют продукт, проявляющий тестостероногенные свойства.

Благодаря перерастворению супернатанта в этаноле при конечной концентрации до 10%, предложенной очистке 0,2% активированным углем этанольного раствора ПАВ, достигнуто удаление части свободных жирных кислот, холестерина, пигментов, что связано с повышением поверхностно-активных свойств нового препарата (табл. 1,2).

Вводимый витамин Е до указанной конечной концентрации (0,003-0,03%) стабилизирует ПАВ и повышает антиоксидантные свойства продукта.

Срок хранения в течение 1 года в отличие от прототипа до 4 мес.

При обработке осадка, получаемого при осаждении на холоду, новым является переосаждение его смесью этанола с эфиром в указанном соотношении: (1—3): 1. что обеспечивает выделение комплекса нуклеопептид-липидов, а очистка 0,2% активированным углем и ультрафильтрация способствуют удалению нейтральных липидов (жирные кислоты, холестерин), аминокислот и остатков пептидов и выделению комплекса нуклеопептид-липидов, обладающего тестостероногенными свойствами (табл.3).

Следовательно, благодаря предложенной трехэтапной схеме обработки гонад кальмаров впервые достигается одновременное получение двух высокоактивных стабильных препаратов: одного, обладающего свойствами сурфактанта, и другого, обладающего свойствами тестостерона.

Полученный комплекс фосфолипидов содержит следующие компоненты: фосфо-липиды 85-95%, общий холестерин 0,2-1% (по прототипу 0,5-2%), свободные жирные кислоты 3-6% (по прототипу 6-9%), пептиды 0,1-0,3% (по прототипу белки - до 0,5%). Указанный состав характеризуется более высокими поверхностно-активными свойствами при ингаляционном введении в организм: поверхностное натяжение растворов нового целевого продукта минимальное 8,3 и максимальное 40,3 дин/см в отличие от прототипа - соответственно 11,7 и 46,5 дин/см.

В состав второго препарата, обладающего тестостероногенными свойствами и влияющего на синтез гормонов в организме, входят пептиды, связанные с нуклеотидными компонентами: урацилом, уридином, гипоксантином, и с липидами в виде стероидных гормонов в следовых количествах.

Сущность изобретения иллюстрируется конкретными примерами его осуществления и результатами исследования получаемых конечных продуктов как физиологически активных препаратов.

Пример 1.

Этап 1. 100 г гонад кальмара измельчают на мясорубке, заливают 10 объемами этилового спирта и перемешивают в реакторе с мешалкой в течение 3 ч: фильтруют, фильтрат упаривают в вакууме при 40°C. Затем добавляют гексан в соотношении 1:5, перемешивают и отстаивают на холоду в течение 2 часов. После отстаивания получают две фазы: гексановый супернатант и осадок.

Этап 2а. Сначала упаривают в вакууме гексан из супернатанта досуха. Сухой остаток перерастворяют в этаноле при конечной концентрации до 10%, очищают 0,2% активированным углем, фильтруют, добавляют

витамин Е до конечной концентрации 0,03%. Получают первый целевой продукт, комплекс фосфолипидов - 6,0 г, который исследуют на поверхностно-активные свойства.

Этап 26. К осадку, получаемому при осаждении на холоду, после удаления супернатанта, добавляют смесь этанола с эфиром в соотношении 1:1, перемешивают и снова отстаивают на холоду в течение 2 ч до выпадения осадка. Надосадочную жидкость центрифугируют в течение 15 мин при 6000 об/мин и отделяют осадок. Затем надосадочную жидкость упаривают в вакууме досуха, перерастворяют в этаноле при конечной концентрации до 10%, очищают 0,2% активированным углем, фильтруют через обычный бумажный фильтр и проводят ультрафильтрацию через "Милипор фильтр" с размером частиц 0,2 мкм. Получают комплекс - нуклеопептидлипид - 0,58 г, который исследуют на тестостероногенные свойства.

Пример 2.

Этап 1. 100 г гонад кальмара измельчают на мясорубке, заливают 10 объемами этилового спирта и перемешивают в реакторе с мешалкой в течение 3 ч, фильтруют и фильтрат упаривают в вакууме при 40°C. Затем добавляют гексан в соотношении 1:5, перемешивают и отстаивают на холоду в течение 2 часов. После отстаивания получают две фазы - осадок и гексановый супернатант.

Этап 2а. Сначала упаривают гексан из супернатанта в вакууме досуха и сухой остаток перерастворяют в этаноле при конечной концентрации до 10%, очищают 0,2% активированным углем, добавляют витамин Е до конечной концентрации 0,003% и получают

первый целевой продукт - комплекс фосфолипидов в количестве 6,2 г, который исследуют на поверхностно-активные свойства.

Этап 2б. К осадку, получаемому при осаждении на холоду, после удаления супернатанта добавляют смесь этанола с эфиром в соотношении 3:1, перемешивают и снова отстаивают на холоду в течение 2 ч до выпадения осадка. Надосадочную, после центрифугирования в течение 15 мин при 6000 об/мин и отделения осадка, упаривают в вакууме досуха, перерастворяют в этаноле при конечной концентрации до 10% и очищают 0,2% активированным углем, фильтруют через обычный бумажный фильтр и проводят ультрафильтрацию через "Милипор фильтр" с размером частиц 0,2 мкм. Получают физиологически активный комплекс - нуклеопептидлипид - 0,7 г, который исследуют на тестостероногенное действие.

Пример 3. Испытание на поверхностно-активные свойства проводят в сравнении с препаратом по способу-прототипу, по методу втягивающей силы пластинки с помощью вертикальных весов Вильгельми.

Снижение поверхностного натяжения как минимального, так и максимального, по сравнению с прототипом, подтверждают более высокие поверхностно-активные свойства препарата, получаемого согласно новому способу.

Пример 4. Испытание получаемого согласно новому способу комплекса нуклео-пептидлипид по тесту на определение тестостеронооой активности проводят радиоиммунологическим методом набором К1Т.

Крыс самцов в возрасте 2-2,5 лет (весом 500-550 г) разделяют на две группы по 6 животных: I группа - контрольная, II группа - для испытания комплекса нуклеопептидлипидов из гонад кальмара..»

Препарат вводят внутримышечно из расчета 0,1 мг на 100 г массы в течение 10 дней. Измеряют уровень тестостерона в крови в начале опыта и после 10-дневного курса радиоиммунологическим методом набором К1Т.

Результаты анализа представлены в табл.2, где показано увеличение исходного уровня тестостерона в крови.

Как следует из табл.3 введение старым животным комплекса нуклеопептидлипид оказывает выраженный эффект увеличения концентрации тестостерона в крови. Выделенный комплекс нуклеопептидлипид, обладающий резко выраженным влиянием на секрецию половых стероидов, представляет основу препарата, эффективного при нарушении половой функции, преждевременном старении, климактерическом периоде. Полученный препарат является природным биологическим регулятором синтеза стероидных гормонов при вышеуказанных патологиях.

Таблица 1

Исследуемые препараты	Содержание неорганического фосфора, мкг/мл	Содержание азота, мкг/мл	Содержание общих липидов, мкг/мл	Качественный анализ нуклеотипных компонентов	Содержание аминокислот в гидролизате, мкг/мл
1. Комплекс фосфолипидов	300-400	140-160	60-80		3-5
2. Комплекс нуклеопептид-липид	50-70	600-700	Следы / от 0,001- до 0,003/ мкг/мл	урацил уридин гипоксантин	120-160

Таблица 2

Поверхностное натяжение	Комплекс фосфолипидов по способу-прототипу (дин/см)	Комплекс фосфолипидов по заявляемому способу (дин/см)
Минимальное	$11,7 \pm 0,8$	$8,3 \pm 0,6$
Максимальное	$46,5 \pm 0,74$	$40,3 \pm 0,2$
	$p < 0,005$	$p < 0,005$

Таблица 3

Группы животных	Исследуемые препараты	Исходный уровень тестостерона	Уровень тестостерона после введения препарата п/моль/л <sup>-1</sup>
1	Физраствор	$0,68 \pm 0,07$	$0,72 \pm 0,08$
2	Фракция комплекса нуклеопептид-липид	$0,60 \pm 0,04$	$14,65 \pm 3,72$