



УКРАЇНА

(19) UA (11) 83530 (13) C2  
(51) МПК (2006)  
A61K 36/07 (2008.01)  
A61P 3/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІЛКОВО-ПОЛІСАХАРИДНОГО КОМПЛЕКСУ ГІПОЛІПІДЕМІЧНОЇ ДІЇ

1

(21) а200608048

(22) 17.07.2006

(46) 25.07.2008, Бюл.№ 14, 2008 р.

(72) КУЧЕРЕНКО НАТАЛІЯ ВАСИЛІВНА, UA, ДЕМ'ЯНЕНКО ВІКТОР ГРИГОРОВИЧ, UA, СТОЛЕТОВ ЮРІЙ ВІТАЛІЙОВИЧ, UA

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, UA

(56) Промышленная технология лекарств: (Учебник. В 2-х т. Том 2 / В.И. Чуешов, М.Ю. Чернов, Л.М. Хохлова и др.). Под ред. проф. В.И. Чуешова. - X.: МТК - Книга; Издательство НФАУ, 2002. - С.274-276.

UA 24032 C1, 31.08.1998.

RU 2097989 C1, 10.12.1997.

RU 2189395 C2, 20.09.2002.

2

RU 2192873 C1, 20.11.2002.

Возделывание вешенки. Піднято з Internet: RU 2188031 C1, 27.08.2002.

RU 2187317 C2, 20.08.2002.

(57) Спосіб одержання білково-полісахаридного комплексу гіполіпідемічної дії шляхом екстракції сировини водою з наступним упарюванням одержаного екстракту, осадженням спиртом етиловим, відокремленням та сушкою осаду, який **відрізняється** тим, що як сировину використовують гриб *Pleurotus ostreatus*, екстракцію проводять принаймні тричі у співвідношенні сировина : екстрагент 1:15-16 протягом 60 хвилин при температурі 50-60°C та постійному перемішуванні, екстракт упарюють до 1/30 від попереднього об'єму, осаджують трикратною кількістю спирту етилового 96%.

Винахід відноситься до фармації та медицини, а саме до способів одержання біологічно активних речовин з природної сировини, зокрема до способів одержання білково-полісахаридного комплексу гіполіпідемічної дії з гриба *Pleurotus ostreatus*.

Проблема створення нових засобів гіполіпідемічної дії є актуальною. На даний час існують лише синтетичні препарати подібної спрямованості дії, які викликають суттєві побічні реакції і мають певні протипоказання у окремих категорій хворих. Створення природних засобів гіполіпідемічної дії, які є більш споріднені організму людини і мають м'яку дію вирішує питання фармакотерапії в геронтології і педіатрії.

Відомим є спосіб отримання БАР білкової природи рослинного походження - ферменту уреазы з насіння кавуна звичайного (*Citrollus vulgaris* L.). [Промышленная технология лекарств: (Учебник. В 2-х т. Том 2 / В.И. Чуешов, М.Ю. Чернов, Л.М. Хохлова и др.). Под ред. проф. В.И. Чуешова. - X.: МТК - Книга; Издательство НФАУ, 2002. - С.274-276.].

Подрібнене насіння екстрагують сумішшю розчинів натрію хлориду і натрію гідрокарбонату (pH 7,9-8,1) протягом двох годин при температурі 22±2°C. Далі екстракт піддають центрифугуванню

в два етапи. Після цього екстракт охолоджують до -10°C. Виділення уреазы з екстракту здійснюють шляхом обробки його насиченим розчином амонію сульфату в буферному розчині (pH 7,0) при періодичному перемішуванні. Суспензію осаду білка відстоюють протягом 6 годин, далі центрифугують протягом 20 хвилин. Осад супутнього білка відкидають, а надосадову рідину знов піддають висюлюванню амонію сульфатом. Суспензію відстоюють протягом 12 годин, центрифугують. Отриманий осад розчиняють в очищеній воді і охолоджують до +10°C. Далі проводять фракційне осадження ферменту етанолом у співвідношенні 1:2, центрифугують протягом 15 хвилин. Осад розчиняють в очищеній воді і сушать сублімацією з оптимальним режимом температур від -40°C до +30°C. Тривалість заморожування - висушування 2-3 години, досушування - 8-10 годин.

До недоліків відомого способу можна віднести складний та тривалий процес отримання і низький вихід кінцевого продукту.

В якості прототипу заявленного способу обраний спосіб одержання комплексу полісахаридів протиалергічної дії з листя смородини чорної [Патент 24032, Україна, МПК6 А61К35/78, 3.95125519, заявл. 28.12.95, опубл. 31.08.98, Бюл. №4.], що

C2  
(13)

83530  
(11)

UA  
(19)

передбачає екстракцію сировини гарячою водою при 90°C у співвідношенні сировина: екстрагент 1:5-6. Екстракцію проводять протягом 3 годин при перемішуванні при постійній підтримці температури 90°C, причому одну й ту ж порцію сировини піддають екстракції тричі. Одержані екстракти об'єднують та упарюють до 1/7 попереднього об'єму. Осадження біологічно активного комплексу проводять чотирикратною кількістю спирту етилового 92-95% і залишають на добу для повного осадження. Осад відділяють, промивають етиловим спиртом, сушать і подрібнюють. Вихід готового продукту становить 13-14% від повітряно-сухої сировини.

Зазначений спосіб дозволяє одержати засіб з конкретним видом фармакологічної активності - протиалергійної. Недоліками способу можна вважати відносну тривалість процесу екстракції та підвищені витрати спирту при осажденні біологічно активного комплексу. Крім того, проведення екстракції при температурі 90°C за відомим способом не дозволяє отримувати речовини білкової природи з ферментативною активністю, які є термолабільними.

Завданням винаходу є створення нового способу одержання білково-полісахаридного комплексу гіполіпідемічної дії шляхом екстракції гриба *Pleurotus ostreatus* водою при заданих параметрах способу, в результаті чого одержують біологічно активну субстанцію білкової природи з ферментативною гіполіпідемічною активністю, яка може бути використана як активна діюча речовина у складі

лікарських засобів, виконаних у різних лікарських формах.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі одержання білково-полісахаридного комплексу гіполіпідемічної дії шляхом екстракції сировини водою з наступним упарюванням одержаного екстракту, осадженням спиртом етиловим, відокремленням та сушкою осаду, згідно з винаходом, передбачено, що в якості сировини використовують гриб *Pleurotus ostreatus*, екстракцію проводять у співвідношенні сировина:

- екстрагент 1:15-16 протягом 60 хвилин при температурі 50-60°C, екстракт упарюють до 1/30 попереднього об'єму і осаджують трикратною кількістю спирту етилового.

Вибір екстрагенту та параметрів заявленого способу здійснено експериментальним шляхом з урахуванням ступеню біологічної активності одержаного комплексу, його ефективності, доступності та нешкідливості екстрагенту, практичного відтворення способу у промислових умовах.

Біологічно активні сполуки гриба *Pleurotus ostreatus* білкової та полісахаридної природи належать до гідрофільних або розчинних у воді.

Експериментальне встановлено, що використання в якості екстрагента води 50-60°C при одержанні білково-полісахаридного комплексу забезпечує найбільш повну екстракцію біологічно активних речовин. Результати дослідів з вибору оптимального екстрагенту за кількісним виходом екстрактивних речовин з сировини наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Вибір виду екстрагента

Екстрагент	вода 50-60°C	20% етанол	40% етанол
Кількісний вихід екстрактивних речовин, %	69,542	60,512	52,456

Аналіз даних свідчить, що максимально ефективна екстракція досягається при використанні у якості екстрагенту води 50-60°C. При таких умовах виключається руйнування термолабільних екстрактивних речовин. Експериментальним шляхом доведено, що співвідношення сировина-екстрагент 1:15-16 є найбільш оптимальним для заявленого способу. Менша кількість екстрагенту не дозволяє ефективно провести екстракцію і створює складності технологічного характеру при обробці великої кількості сировини. Збільшення кількості екстрагенту недоцільно, бо повна екстракція досягається заявленою його кількістю.

В ході експериментів було визначено, що оптимальним часом процесу екстракції для заявленого способу є 60 хвилин. Для вичерпного вилучення БАР з сировини бажано одну й ту ж порцію сировини піддавати екстракції принаймні тричі.

Експериментальним шляхом визначено оптимальний об'єм упареного екстракту (до 1/30 попереднього об'єму), а відтак непрямым чином - його концентрація та необхідна трикратна кількість спирту етилового для осадження комплексу БАР.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином. Висушений подрібнений гриб *Pleurotus ostreatus* завантажують у реактор і заливають водою 50-60°C у співвідношенні сировина: екстрагент 1:15-16. Екстракцію проводять протягом 60 хвилин при перемішуванні при підтриманні постійної температури 50-60°C. Для максимального вилучення БАР з сировини кожен порцію сировини піддають екстракції тричі. Одержані екстракти об'єднують і упарюють на вакуум-випарному апараті до 1/30 попереднього об'єму. До упареного екстракту додають спирт етиловий 96% у співвідношенні екстракт: спирт 1:3, що призводить до осаження комплексу БАР. Надосадову рідину видаляють при фільтрації під вакуумом. Одержаний осад піддають вакуумній сушці при температурі 50-60°C протягом 7 годин. Вихід готового продукту складає 44-45% від повітряно-сухої сировини.

В результаті здійснення заявленого способу одержують водорозчинний білково-полісахаридний комплекс - порошок світло-коричневого кольору зі специфічним запахом, со-

лонувано-кислий на смак, гігроскопічний, дуже добре розчинний у воді, практично нерозчинний в ефірі і хлороформі.

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1. 100,0г подрібненої висушеної маси гриба *Pleurotus ostreatus* заливали водою 50°C у співвідношенні сировина-екстрагент 1:15 і екстрагували на водяній бані при температурі 50°C протягом 60 хвилин. Витяг злили. Операцію повторили 3 рази. Отриманий сумарний водний екстракт (3,23 л) упарили під вакуумом при температурі 50°C до загального об'єму 100мл. До упареного екстракту додали спирт етиловий 96% у співвідношенні 1:3. Відділили надосадову рідину за допомогою вакууму. Отриманий осад висушили у вакуум-сушильній шафі при температурі 50°C протягом 7 годні. Вихід водорозчинного білково-полісахаридного комплексу склав 44,04%.

Приклад 2. Гіполіпідемічну дію водорозчинного білково-полісахаридного комплексу, одержаного за заявленим способом, вивчали на моделі експериментальної гіперліпідемії. Дослідження проводили на білих щурах лінії Вістар. Всі тварини були згруповані у 3 групи: 1 група - контроль-патологія (тварини з експериментальною гіперліпідемією), 2

група - тварини, ліковані ловастатином в дозі 1,5мг/кг (ОД<sub>50</sub> у щурів), 3 група -тварини, ліковані засобом, отриманим за заявленим способом, в дозі 1,0г/кг.

Експериментальну гіперліпідемію у щурів викликали введенням холестерину в дозі 0,5г/кг і 30% насичених жирів, а також 5000 МО вітаміну Д на протязі 3-х тижнів. Холестерин у вказаній дозі вводили тваринам внутрішньошлунково у вигляді суспензії на соняшниковій олії. В якості насиченого жиру використовували свинячий жир, який щури отримували одночасно із кормом як і вітамін Д.

Препаратом порівняння був обраний Ловастатин-КМП (БАТ "Київ медпрепарат").

Критеріями оцінки гіполіпідемічної дії досліджуваного засобу було визначення у сироватці крові щурів: загального холестерину (ЗХС), холестерину ліпопротеїнів низької щільності (ХС ЛПНЩ) - атерогенний фактор, та холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ХС ЛПВЩ) -антиатерогенний фактор.

Результати вивчення гіполіпідемічної активності засобу, отриманого за заявленим способом, та Ловастатину-КМПГ в умовах експериментальної гіперліпідемії у щурів наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Вивчення гіполіпідемічної дії білково-полісахаридного комплексу, одержаного з гриба *Pleurotus ostreatus* за заявленим способом

Група тварин	Рівень ЗХС, %	Рівень ХС ЛПНЩ, %	Рівень ХС ЛПВЩ, %
Контроль-патологія	100	100	100
Засіб, отриманий за заявленим способом	61,7	48,9	133,0
Ловастатин-КМП	45,3	40,0	131,0

Дані таблиці 2 свідчать, що засіб, отриманий за заявленим способом, сприяв зниженню рівню загального холестерину сироватки крові щурів на 38,3%, холестерину ліпопротеїнів низької щільності - на 51,1%, та підвищував рівень холестерину ліпопротеїнів високої щільності на 33%.

Таким чином, можна зробити висновок, що водорозчинний білково-полісахаридний комплекс з гриба *Pleurotus ostreatus*, одержаний у відповідності з заявленим способом, виявляє виражену гіполіпідемічну активність: зменшує рівень атерогенних факторів (ЗХС, ХС ЛПНЩ), та підвищує рівень антиатерогенного фактора (ХС ЛПВЩ). За своєю гіполіпідемічною активністю засіб незначно поступається гіполіпідемічній дії референс - препарату Ловастатину-КМПГ за зниженням атерогенних фак-

торів, проте не поступається йому за підвищенням антиатерогенного фактору.

В результаті здійснення заявленого способу одержують біологічно активну субстанцію з вираженою гіполіпідемічною активністю, яка є перспективною для використання в якості лікарської субстанції для створення лікарських препаратів.

Заявлений спосіб дає змогу одночасно отримати два класи біологічно активних речовин у складі одного комплексу і має високий вихід цільового продукту.

Спосіб передбачає використання поширеної в Україні доступної сировини і може бути здійснений в умовах хіміко-фармацевтичних підприємств з використанням стандартного обладнання.