



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 46798

(13) C2

(51) 6 A61K35/70

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ВОДОРОЗЧИННОГО ГРИБНОГО МЕЛАНІНУ

1

2

(21) 98052293

(22) 06 05 1998

(24) 17 06 2002

(46) 17 06 2002, Бюл. № 6, 2002 р.

(72) Борщевська Марина Іллівна, Жебровська Філя Іванівна, Шуляківська Катерина Борисівна

(73) ВІДКРИТЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО "ФА-РМАК"

(56) WO 9216189, 1992

Лях С.П., Рубан Я.Л. Микробные меланины, 1972, т. 5, стр. 158 - 163

(57) Спосіб одержання водорозчинного грибного меланіну, що включає кип'ятіння протягом 2 годин суспензії меланіну в розчині ідкого натрію, фільтрацію, осадження розчинених фракцій меланіну соляною кислотою, фільтрацію осадженого меланіну, розчинення його в розчині ідкого натрію, розливання в ампули і стерилізацію, який відрізня-

ється тим, що меланін кип'ятять в 25-30-кратній кількості 1 н розчину ідкого натрію, меланін, що не розчинився, промивають на фільтрі 10-кратною кількістю гарячої (80-90°C) води, розчинені в лугові фракції меланіну осаджують концентрованою соляною кислотою при pH 1-2, суміш витримують без перемішування протягом 6 годин, відфільтрований меланін, не промиваючи, підсушують протягом 3 годин вакуумом на фільтрі, суспендують в теплій воді, розчиняють суспензію за допомогою 1 н розчину ідкого натрію до pH 5,7 ± 0,4, розчин кип'ятять протягом 1 години, фільтрують, розводять очищеною водою в об'ємі, необхідному для одержання потрібної концентрації, додають натрій хлорид до одержання ізотонічного розчину, фільтрують через фільтр "Міліпор" з d = 0,45 мкм, стерилізують при 100 °C протягом 30 хвилин

Винахід відноситься до хіміко-фармацевтичної промисловості, зокрема до способів одержання водорозчинних меланінів. Вихідним продуктом для одержання водорозчинного меланіну є меланін, продукований грибом рослинного походження *Cladosporium Cladosporioides* 396 (продуцент-штамм гриба *Cladosporium Cladosporioides* 396 - захищений а с 1063834А, заявлено на спосіб одержання меланіну з біомаси гриба, р н 97128128)

Відомо, що меланіни є гетерополімерами, які мають гідроксильні, карбоксильні і карбонільні групи, і що вони мають властивості поліаніонів [1, 2]

Молекулярний склад меланінів неоднорідний і вони можуть бути розділені з допомогою стандартного методу [2, 4] на чотири фракції, які відрізняються фізико-хімічними властивостями. Проте, всі чотири фракції не розчиняються в воді, що спричиняє складності при одержанні готових лікарських форм із меланіну і проведенні фармакологічних експериментів

Відомі два способи одержання водорозчинного меланіну, одержуваного із гриба *Pullularia prototropha* [5, 6]

Суть методу [5] полягає в розчиненні меланіну

в незначній кількості 0,5 - 1% розчину ідкого калію або ідкого натрію. Від надлишку катіонів натрію і калію позбавляються при допомозі діалізу проти дистильованої води до постійного pH, близького до значення 7. Потрібну концентрацію пігменту одержують розбавленням основного розчину водою. Згідно способу [5] одержують водні розчини натрієвої або калієвої солі меланіну. Спосіб дорогий і не має цінності для виробництва у зв'язку з відсутністю промислового обладнання для проведення діалізу

Близьким до способу, що заявляється, є спосіб [6], згідно якого меланін суспендують в 10 об'ємах 0,5 н, ідкого натру, суспензію кип'ятять на протязі 2 годин, частину, що не розчинилась, відділяють центрифугуванням, а пігмент меланіну висаджують підкисленням соляною кислотою до pH 4,0. Осад промивають водою до нейтральної реакції, потім етанолом, ацетоном та сушать. Наважку меланіну розчиняють в невеликій кількості 0,59% розчину ідкого натрію, а потім з допомогою соляної кислоти встановлюють pH 7,0. Потрібну концентрацію меланіну одержують розбавленням отриманого розчину фізіологічним розчином. Одержаний колоїдний розчин меланіну ступінчато сте-

(13) C2

(11) 46798

(19) UA

рипізують

Так як меланіни різних продуцентів, окрім загальних властивостей, які дозволяють ідентифікувати їх і віднести до класу "справжніх меланінів", мають свої особливості, то і способи одержання з них розчинних в воді препаратів повинні враховувати специфічні особливості конкретного меланінового пігменту

В основу винаходу поставлено завдання розробки промислового способу одержання розчинного в воді препарату меланіну, виділеного з біомаси гриба *Cladosporium Cladosporioides* 396, який за рахунок умов розчинення меланіну, сукупності і послідовності операцій по видавленню білково-ліпідно-полісахаридних залишків зруйнованої клітини дозволив би одержати розчин меланіну - глибокоочищений, стійкий при зберіганні - при мінімальних економічних витратах і технологічний простоти процесу

Поставлене завдання вирішується тим, що меланін, виділений з гриба *Cladosporium Cladosporioides* 396, кип'ятять з 1 н розчином ідкого натрису, суспензію фільтрують, меланін, що не розчинився, промивають очищеною водою, фільтрати об'єднують

Додаванням до об'єданого фільтрату концентрованої соляної кислоти до pH = 1 - 2 висаджують розчинені фракції меланіну, відокремлюють їх від маточника фільтрацією, після чого знову суспендують в невеликій кількості очищеної води, суспензію, підігрівають до 40 - 50°C і розчиняють меланін додаванням 1 н розчину ідкого натрію до pH 5,7 \pm 0,4, розчин кип'ятять на протязі 1 години, охолоджують, фільтрують, фільтрат розбавляють очищеною водою до потрібної концентрації і додавають розраховану кількість хлориду натрію, до ізотонії розчину

Технічний результат, що досягається здійсненням винаходу, полягає в одержанні високочистого, стабільного при зберіганні колоїдного розчину натрієвої солі меланіну при незначних матеріальних затратах

Спосіб здійснюється наступним шляхом

Суспензію меланіну в 25 - 30-кратній кількості 1 н розчину ідкого натрію кип'ятять із зворотним холодильником на протязі 1,5 - 2,5 години, охолоджують до 30 \pm 5°C і фільтрують

Нерозчинений меланін на фільтрі промивають 10-кратною кількістю гарячої (85 \pm 5°C) очищеної води. Фільтрати об'єднують. До об'єданого фільтрату додають концентровану соляну кислоту до pH 1 - 2. Суміш перемішують на протязі 30 хвилин і витримують без перемішування на протязі 6 годин. Зкоагульований меланін фільтрують і підсушують витримуванням на нутч-фільтрі на протязі 3 годин. Одержану пасту меланіну знову суспендують в теплій (45 \pm 5°C) очищеній воді у співвідношенні 1 : 60. До отриманої суспензії додавають 1 н розчин ідкого натрію до pH = 5,7 \pm 0,4. Суміш кип'ятять на протязі 1 години зі зворотним холодильником, охолоджують до 30 \pm 5°C і фільтрують. Розчин розбавляють очищеною водою до потрібної концентрації, розчиняють в ньому натрій хлористий до ізотонії розчину, фільтрують через фільтр "Міліпор" з d = 0,45мкм, розливають в ампули темного скла і стерилізують при 100°C на протязі 30 хви-

лин

Приводимо конкретні приклади здійснення винаходу

Приклад 1

В реактор з мішалкою, зворотним холодильником і термометром загрузають 35г меланіну і 1000мл 1 н розчину ідкого натрію. Суспензію гріють при перемішуванні до кипіння і витримують на протязі 2 годин. Після закінчення витримки суспензію охолоджують до 35°C і фільтрують. Меланін, що не розчинився, промивають на фільтрі 350мл гарячої (90°C) очищеної води. Фільтрати об'єднують. Із об'єданого фільтрату осаджують меланін подачею при перемішуванні концентрованої соляної кислоти до pH 1. Меланін випадає в вигляді пластівців, які розподіляються у всьому об'ємі суміші

Суміш перемішують на протязі 30 хвилин, перевіряють pH, виключають перемішування і залишають відстоюватись на протязі 6 годин. Зкоагульований у вигляді щільного шару внизу реактора меланін відфільтровують і підсушують на фільтрі вакуумом на протязі 3 годин. Пасту меланіну суспендують в 600мл очищеної води, підігрітої до 50°C. Суспензію перемішують на протязі 20 хвилин і розчиняють меланін додаванням 1 н розчину ідкого натрію до pH = 5,7

Одержаний розчин меланіну нагрівають до кипіння і витримують на протязі 1 години, після чого охолоджують до 30°C і фільтрують

Визначають вміст меланіну в розчині і догружають очищену воду в об'ємі, необхідному для одержання 1% розчину меланіну. В одержаному розчині визначають вміст хлоридів і догружають потрібну кількість хлориду натрію до ізотонії розчину

Розчин фільтрують через фільтр "Міліпор" з d = 0,45мкм

Одержують 1180 мл 1% розчину меланіну в вигляді його натрієвої солі

Розчин розливають в ампули темного скла і стерилізують при 100°C на протязі 30 хвилин

Приклад 2

В реактор з мішалкою, зворотним холодильником і термометром загрузають 35г меланіну і 900мл 1 н розчину ідкого натрію. Суспензію гріють при перемішуванні до кипіння і витримують на протязі 2 годин. Після закінчення витримки суспензію охолоджують до 30°C і фільтрують. Не розчинений меланін на фільтрі промивають 350мл гарячої (85°C) очищеної води

Фільтрати об'єднують. Із об'єданого фільтрату осаджують меланін подачею при перемішуванні концентрованої соляної кислоти до pH 1,5. Суміш перемішують 30 хвилин, перевіряють pH і залишають відстоюватись без перемішування на протязі 6 годин. Меланін відфільтровують і підсушують на фільтрі вакуумом на протязі 3 годин. Пасту меланіну суспендують в 600мл очищеної води, підігрітої до 50°C. Суспензію перемішують на протязі 20 хвилин і розчиняють меланін додаванням 1 н розчину ідкого натрію до pH = 5,6. Одержаний розчин меланіну нагрівають до кипіння і витримують на протязі 1 години, після чого охолоджують до 30°C і фільтрують

Визначають вміст меланіну в розчині і догру-

жають очищену воду в об'ємі, необхідному для одержання 1% розчину меланіну

В одержаному розчині визначають вміст хлоридів і догружають потрібну кількість натрія хлориду до ізотонії розчину

Розчин фільтрують через фільтр "Міліпор" з $d = 0,45 \text{ мкм}$

Одержують 1050мл 1% розчину меланіну в вигляді його натрієвої солі

Розчин розливають в ампули темного скла і стерилізують при 100°C на протязі 30 хвилин

Приклад 3

В реактор з мішалкою, термометром і зворотним холодильником загружають 35г меланіну і 950мл 1 н розчину ідкого натру

Суспензію нагрівають при перемішуванні до кипіння і витримують на протязі 1,5 годин Після закінчення витримки суспензію охолоджують до 35°C і фільтрують

Нерозчинений меланін на фільтрі промивають 350мл гарячої (80°C) очищеної води

Фільтрати об'єднують Із об'єданого фільтрату висаджують меланін подачею при перемішуванні концентрованої соляної кислоти до pH 2 Суміш витримують без перемішування на протязі 6 годин Меланін відфільтровують і підсушують на фільтрі вакуумом на протязі 3 годин Пасту меланіну суспензують в 600мл очищеної води, нагрітої до 50°C Суспензію перемішують на протязі 20 хвилин і розчиняють меланін подачею 1 н розчину ідкого натру до pH 5,9 Одержаний розчин меланіну нагрівають до кипіння і витримують на протязі 1 години, після чого охолоджують до 30°C і фільтрують Визначають вміст меланіну в розчині і догружають очищену воду в об'ємі, необхідному для одержання 1% розчину меланіну В одержаному розчині визначають вміст хлоридів і догружають потрібну кількість натрія хлориду до ізотонії розчин Розчин фільтрують через фільтр "Міліпор" з $d = 0,45 \text{ мкм}$

Одержують 1100мл 1% розчину меланіну в вигляді його натрієвої солі

Розчин розливають в ампули темного скла і стерилізують при 100°C на протязі 30 хвилин

Таблиця

Порівняльний аналіз способу, що заявляється і прототипу

Прототип	Спосіб, що заявляється
1 Суспендування меланіну в 0,5 н, розчині ідкого натру при співвідношенні реагентів $\frac{\text{меланін}}{0,5\text{нNaOH}} = \frac{1}{10}$	1 Суспендування меланіну в 1н, розчині ідкого натру при співвідношенні реагентів $\frac{\text{меланін}}{1\text{нNaOH}} = \frac{1}{25 - 30}$
2 Кип'ятіння на протязі 2 годин	2 Кип'ятіння на протязі 2 годин
3 Фільтрація	3 Фільтрація
4 Осадження меланіну соляною кислотою при pH 4,0	4 Осадження меланіну соляною кислотою при pH 1 - 2
5 Фільтрація меланіну	5 Витримка без перемішування на протязі 6 годин

6 Промивка водою, спиртом, ацетоном	дин
7 Сушіння	6 Фільтрація меланіну
8 Розчинення меланіну в 0,59% розчині ідкого натрію	7 Підсушування вакуумом на фільтрі
9 Підкислення розчину меланіну соляною кислотою до pH 7,0	8 Суспендування меланіну у воді і розчинення додаванням до водної суспензії 1н розчину ідкого натру до pH = $5,7 \pm 0,4$
10 Приготування "фізіологічного" розчину	9 Кип'ятіння на протязі 1 години (100°C)
11 Розбавлення одержаного колоїдного розчину натрієвої солі меланіну "фізрозчином" до потрібної концентрації	10 Фільтрація
12 Розлиття в ампули	11 Загрузка води в об'ємі, необхідному для одержання потрібної концентрації
13 Стерилизація	12 Загрузка хлориду натрію до ізотонії розчину
	13 Розлиття в ампули
	14 Стерилизація

Сукупність і послідовність операцій процесу, що заявляється, величини режимів і параметрів, що заявляються, а також співвідношення компонентів достатні і необхідні для досягнення поставленого у винаході завдання

Співвідношення реагентів, що заявляються (меланін, розчин ідкого натрію), а також концентрація розчину ідкого натрію визначені експериментально Загрузка меншої кількості розчину ідкого натру спричиняє неповне вилучення розчинних в лузі фракцій меланіну Збільшення кількості розчину ідкого натру не доцільне з економічних міркувань, через те, що не призводить до збільшення виходу меланіну При використанні менш концентрованого розчину ідкого натрію має місце неповне вилучення розчинних у лузі фракції меланіну Використання більш концентрованого розчину ідкого натру небезпечно в аспекті теоретично можливої деструкції меланіну

Промивка нерозчинної в лузі фракції меланіну гарячою водою проводиться з метою повного вилучення з нього розчинних фракцій Температура очищеної води і її кількість підібрані експериментально При зменшенні температури води на промивку, а також при зменшенні її кількості, з меланіну на фільтрі (що має, завдяки своїй фізичній природі, подібну до пилу структуру і, внаслідок цього, утворює на фільтрі дуже цільний шар) не повністю вилучаються розчинні в лузі фракції і зменшується вихід меланіну

Спосіб, що заявляється, дозволяє одержати високочистний колоїдний розчин натрієвої солі меланіну потрібної концентрації

ЛІТЕРАТУРА

- С П Лях, Я Л Рубан Досягнення мікробіології, № 5, 90 (1968)
- С П Лях, Я Л Рубан Мікробні меланіни, М 1972
- С П Лях, Я Л Рубан Відомості АН СРСР Сер "Біологія", № 4, 530 (1968)
- А А Малама, Г Б Храменко, П А Буланов, А Я Рубенчик Мікробіологія, 43, вип 3, 453 (1974)
- А А Малама, П А Буланов ДАН БРСР, 9, № 9,

627 (1965)

6 А. А. Малама Характеристика гриба *Pullularia prototropa*, одержання з нього полісахариду і меланіну і вплив даних біополімерів на пухлину Ерліха, автореф. канд. дисерт. - Мінськ, 1968

7 А. А. Малама Вплив методу приготування розчинів меланінових пігментів на їх біологічну активність. Матеріали до II з'їзду біохіміків Лит. РСР, Вільнюс, 1975

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)
вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна
(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»
вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна
(044) 216 – 32 – 71