



УКРАЇНА

(19) UA (11) 81358 (13) C2
(51) МПК (2006)
A61K 35/48МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ ГІДРОФІЛЬНОЇ ФРАКЦІЇ З ТКАНИН ПЛАЦЕНТИ СВИНЯЧОЇ

1

(21) а200603665

(22) 03.04.2006

(24) 25.12.2007

(72) КОНЕВ ВОЛОДИМИР ФЕДОРОВИЧ, UA,
ГРЕБЕНШІКОВ ВІКТОР ЮХИМОВИЧ, UA, КУРИЛО
МИКОЛА ФЕДОРОВИЧ, UA, ФІЛОНЕНКО
СВІТЛАНА МИКОЛАЇВНА, UA, ШАБУНІН СЕРГІЙ
ВИКТОРОВИЧ, UA(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "ЗООВЕТЕРИНАРНИЙ
ЦЕНТР", UA

(56) UA A1 2710, 15.04.94.

UA A 20274, 15.07.97.

UA 20040806563, 15.02.06.

RU A 2003124738, 20.02.05.

2

RU C1 2228759, 20.05.04.

RU C1 2237486, 10.10.04.

(57) Спосіб одержання біологічно активної
гідрофільної фракції плаценти свинячої, що
включає попереднє відмивання плаценти у воді,
кріоконсервування до температури (-80)...(-120) °C
парами рідкого азоту і кріоздрібнювання до
розміру часток 20-30 з наступним екстрагуванням
суміші і фільтрацією екстракту, який
відрізняється тим, що здрібнений порошок
попередньо розморожують до температури 20-35
°C, а екстрагування проводять водою
дистильованою, при співвідношенні порошок:вода
1:2, при постійному перемішуванні протягом 2-3
годин при цій же температурі.

Винахід відноситься до області ветеринарії,
медицини, косметології і рослинництва.

Відомий спосіб [пат. РФ № 2228759,
A61K35/50] одержання гідрофільної фракції з
тканин плаценти свинячої, який включає
попереднє відмивання плаценти у воді,
кріоконсервування до температури (-80) - (-120)°C
і кріоздрібнювання до розміру часток 20-30мкм.
Здрібнену і заморожену тканину плаценти
піддають кріосублімаційному фракціюванню при
температурах у діапазоні (-10) - (-20)°C і тиску не
вище $1,3 \times 10^{-4}$ атм. Фракцію, що випаровується
(ліофілізовану) із заморожених тканин плаценти,
конденсують на кріогених панелях, охолоджуваних
рідким азотом до температури -196°C. Час
фракціювання складає 16-20 годин. Після
завершення процесу кріосублімаційного
фракціювання кріогенні панелі отеплюються до
+15°C і сконденсована на них водна фракція, що
містить комплекси амінокислот і мікроелементів,
стікає в приймач. Отриманий екстракт фільтрують.

Даний спосіб забезпечує недостатньо високу
концентрацію вмісту амінокислот і мікроелементів,
що витягаються з плаценти (табл.2), а отже і
недостатню біологічну активність фракції, що
пов'язано тим, що сублімування відбувається

шляхом відриву молекул рідини, що містять
молекули біологічно активних речовин з
молекулярною масою не більш 100 умовних
одиниць.

Крім цього, тривалість усього процесу
одержання гідрофільної фракції в цілому складає
24-29 годин, що позначається на собівартості
кінцевого продукту.

Відомий спосіб [пат. РФ № 2237486,
A61K35/50] одержання біологічно активної
гідрофільної фракції з тканин плаценти свинячої,
який включає попереднє відмивання плаценти у
воді, кріоконсервування до температури (-80) - (-
120)°C і кріоздрібнювання до розміру часток 20-
30мкм. Здрібнену і заморожену тканину плаценти
піддають кріосублімаційному фракціюванню при
температурах у діапазоні (-10) - (-20)°C і тиску не
вище $1,3 \times 10^{-4}$ атм. З отриманого порошку
попередньо витягають ліпофільну фракцію
шляхом екстрагування за допомогою хладонових
розчинників, інертних до фракції, що витягається,
під тиском 6-8 атм. і температурі 30-35°C.
Гідрофільну фракцію одержують екстрагуванням
знежиреного порошку-залишку після ліпофільної
екстракції за допомогою ізотонічного водного
розчину хлориду натрію при температурі 25-30°C

(13) C2

(11) 81358

(19) UA

протягом 3-4 години при постійному перемішуванні. Екстрагування повторюють двічі. Потім екстракт фільтрують.

Таким чином, процес одержання гідрофільної фракції, на відміну від попереднього аналога, складає 6-8 годин, що знижує тривалість процесу і, у порівнянні з аналогом, забезпечує збільшення змісту амінокислот і мікроелементів у плаценті майже в 2 рази (табл.2).

Однак, переведення комплексу біологічно активних речовин, що утримуються в кріоконсервованій плаценті, із замороженого стану шляхом кріосублімування у твердий стан, а потім шляхом екстрагування фізіологічним розчином у рідкий стан, викликає руйнування структури біологічно активних комплексів, з одного боку, а з іншого боку - приводить до забруднення порошку тканин плаценти фторированими вуглеводнями, що містить хладон. Таким чином це приводить до зниження концентрації вмісту амінокислот і мікроелементів у плаценті, та зменшує її біологічну активність.

Крім того, використання енергоємних технологій кріосублімаційного фракціонування і хладонової екстракції впливає на собівартість гідрофільної фракції.

В основу дійсного винаходу встановлена задача створення способу одержання біологічно активної гідрофільної фракції з тканин плаценти свинячої, що забезпечує збільшення біологічної активності гідрофільної фракції за рахунок збільшення концентрації вмісту амінокислот і мікроелементів.

Прототипом є останній з аналогів.

Рішення задачі забезпечується тим, що в способі одержання біологічно активної гідрофільної фракції з тканин плаценти свинячої, що включає попереднє відмивання плаценти у воді, кріоконсервування до температури $(-80) - (-120)^{\circ}\text{C}$ парами рідкого азоту і кріоздрібнювання до розміру часток 20-30 мкм. з наступним екстрагуванням суміші і фільтрацією екстракту, відповідно до винаходу, здрібнений порошок попередньо розморожують до температури 20-3 5°C , а екстрагування проводять водою дистильованою, узятих у співвідношенні 1:2, при постійному перемішуванні протягом 2-3 годин при цій же температурі.

Як показали наші дослідження, кріоконсервування наступним розморожуванням кріоздрібнюваного порошку до зазначеної температури викликає тільки руйнування клітинних мембран тканин плаценти без порушення самої структури біологічно активних комплексів, що сприяє виділенню міжклітинної і внутрішньоклітинної рідини. В результаті рівень концентрації амінокислот і мікроелементів зберігається практично в нативному стані.

Використання води дистильованої для екстрагування розмороженою в такий спосіб порошку тканин плаценти забезпечує більш повний витяг біологічно активних речовин - мікроелементів і амінокислот, при цьому виключається і забруднення екстракту побічними речовинами, завдяки чому забезпечується

збільшення рівня концентрації вмісту амінокислот і мікроелементів у плаценті, за рахунок чого збільшується і біологічна активність гідрофільної фракції.

Розморожування при температурі вище 35°C недоцільно через руйнування біологічно активних речовин, а використання температури менш 20°C - збільшує тривалість процесу розморожування.

Перемішування суміші водою дисцильованою протягом менш 2-х годин не забезпечує гомогенізацію і проведення повного екстрагування, а збільшення часу більш 3-х годин - недоцільно, тому що не приводить до збільшення концентрації змісту амінокислот і мікроелементів у плаценті.

Співвідношення суміш: вода дистильована виявлена нами експериментально. Збільшення в співвідношенні кількості води дистильованої недоцільно, тому що пов'язано з порушенням стабільності екстракту та збільшенням часу фільтрації екстракту, а зменшення кількості води дистильованої не забезпечує повноту витягу біологічно активних речовин.

У табл.1 наведені значення вмісту іонів Fe^{3+} , мкМ/л, що є критерієм повноти проведення екстрагування гідрофільних речовин, що утримуються в плаценті, при різних значеннях параметрів, що заявляються;

у табл.2 наведений вміст мікроелементів в отриманій гідрофільній фракції в порівнянні з даними аналога і прототипу;

у табл.3 і 4 наведені порівняльні дані по ефективності застосування отриманої гідрофільної фракції для лікування ендометріта й акушерських захворювань свиноматок, відповідно;

у табл.5 наведені порівняльні дані по ефективності застосування отриманої гідрофільної фракції для збільшення схожості насіння озимої пшениці.

Пропонований спосіб реалізують таким чином.

Вихідну плаценту свинячу в кількості 1,0кг промивають водою, фрагментують і піддають швидкому заморожуванню в інтервалі температур $(-80^{\circ}\text{C}) - (-120)^{\circ}\text{C}$ в парах рідкого азоту швидкістю 30°C в хвилину, з наступним здрібнюванням замороженої плаценти на кріо-млині у тому же температурному інтервалі до розміру часток 20-30мкм по відомих технологіях. Здрібнену до зазначених розмірів часток тканини плаценти розморожують в інтервалі температур 20- 35°C (у конкретному прикладі до 25°C), після чого здійснюють екстрагування водою дисцильованою (2л) при цій же температурі протягом 2-х годин за допомогою роторно-пульсаційного апарата. При цьому співвідношення порошку плаценти і води складає 1:2. Отриманий у такий спосіб екстракт фільтрують. Вихід готового продукту (відфільтрованої гідрофільної фракції) складає 65-75% (що залежить від вологості відфільтрованого осаду).

Приклади з іншими значеннями параметрів, що заявляються, наведені в табл.1.

Як витікає з табл.1, рішення поставленої задачі забезпечується тільки в межах параметрів, що заявляються, (прикладі 2, 6, 7). Вміст іонів Fe^{3+} (мкМ/л) збільшилося практично в 3 рази в

порівнянні з прототипом. Вихід хоча б одного параметра за межі величин, що заявляються, не забезпечує рішення задачі.

Табл. 2 підтверджує збільшення концентрації вмісту амінокислот і мікроелементів у плаценті гідрофільної фракції, отриманої за пропонуваним способом, у порівнянні з аналогічними даними відомих способів практично по всіх елементах у 3 рази в порівнянні з прототипом і майже в 4 рази в порівнянні з аналогом.

Проведені іспити використання гідрофільної фракції, отриманої запропонуваним способом, у господарствах Харківській і Вороніжській областях у практичних умовах, свідчать про її більш широкий спектр біологічної дії і більш високе ефективне лікування та профілактику різних захворювань у корів, свиней і молодняку сільськогосподарських тварин, у порівнянні з відомими способами. Дані представлені в табл. 3 і 4, відповідно.

Макро та мікроелементи	Аланін	1100
	Валін	650,7
	Метіонін	434,4
	Изолейтін	755,3
	Лейцин	920
	Тірозін	267,9
	Фенілаланін	425,5
	Гістидін	444,1
	Лізін	1500
	Гамааміномасляна к-та	265,3
	Цитрулін	243,7
	Мідь	6,4
	Цинк	320
	Марганець	15,6

№ дослідів	Кількість		Температура розморожуван. порошку, °C	Тривалість екстрагування, час.	Вміст в екстракті Fe ³⁺ , мкМл	Фосфор неорганічний	Гідроф
	здрібненого порошку, кг	екстрагента вода дистильована литр					
1.	1,0	1,0	25	2,0	735,5	Заявляема	
2.	1,0	2,0	20	2,5	756,8	100	
3.	1,0	3,0	25	3,0	503,4	96	
4.	1,0	2,0	15	2,5	719,4	8,5±0,13	
5.	1,0	2,0	40	2,0	444,8	4	
6.	1,0	2,0	25	2,5	762,4		
7.	1,0	2,0	35	2,0	768,2		
8.	1,0	2,0	25	1,5	761,5	Застосували гідрофільна фракція заявляема	Застосували фракція 22
9.	1,0	2,0	30	4,0	761,5		
Прототип порошок-залишок після ліпофільної екстракції		екстрагент ізотонічний розчин NaCl		Кількість тварин, голів	50		
0,87		30		Захворіло післяпологовими ендометритами, голів	238,15		

Табл. 2

Показники		Вміст, мкМл				насіння	доба
Амінокислоти	Цистенова кислота	Заявляема	Пат. № 2228739	Пат. № 2237486	Пат. № 2237486		
		284,9	1,0	8,22	2,0	81,6	4,0
	Аспарагінова кислота	427,4	-	6,85	78/10	188/54	85/56
	Треонін	896,7	-	6,96	83/13	276/39	95/89
	Серін	769,3	-	10,16	80/12	244/49	95/87
	Глутамінова кислота	744,4	-	17,34	87/8	212/85	93/90
	Гліцин	658,5	-	13,87	79/10	396	91/79

6	-	44/8	77/11	91/34	13,7	18,2
7	-	52/5	70/15	78/35	12,5	17,5

Крім того, отримана гідрофільної фракція помітно впливає на схожість насіння озимої пшениці (табл. 5). В прикладах 1-5 використовувалась отримана гідрофільна фракція в суміші з водою. Для порівняння в прикладі 6 насіння взагалі не оброблялося, а в прикладі 7 насіння оброблялось водою. Після обробки вологість насіння в усіх дослідах дорівнює 5%. Культивування насіння проводилось у чашках Петрі на волокому фільтрувальному папері. Пророщування насіння оцінювалось 1 раз на добу на протязі 4-х діб по пророщуванню стеблів та коренів. Після 4-х діб культивування вимірювалась середня вага коренів та стеблів. Температура культивування коливалась в межах 17-18°C.

В табл. 5 в числівнику наведений % пророщених коренів, а в знаменнику - % пророщених стеблів. Помилка результатів вимірів знаходиться у довірчальній межі - 0,9. Таким чином, з таблиці 5 видно, що гідрофільна фракція з водою перевищує вплив на пророщення коренів е у середньому на 19%, а стеблів на 45% у порівнянні з контрольним (дослід 7).