



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 149 642** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **A 61 K 35/78, 31/715, A 61 P 37/04**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 99117565/14, 09.08.1999
(24) Дата начала действия патента: 09.08.1999
(46) Дата публикации: 27.05.2000
(56) Ссылки: RU 95107681 A1, 27.01.97. RU 2134584 C1, 20.08.99. EP 0382551 A2, 09.02.90.
(98) Адрес для переписки:
167610, г.Сыктывкар, ул. Коммунистическая
24, КНЦ УрО РАН, патентный отдел

(71) Заявитель:
Институт физиологии Коми научного центра
Уральского отделения РАН
(72) Изобретатель: Оводова Р.Г.,
Бушнева О.А., Головченко В.В., Попов
С.В., Оводов Ю.С.
(73) Патентообладатель:
Институт физиологии Коми научного центра
Уральского отделения РАН

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ПОЛИСАХАРИДОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИМ ДЕЙСТВИЕМ

(57) Реферат:
Изобретение относится к медицине, а именно к химико-фармацевтической промышленности, и касается способа получения пектиновых полисахаридов из растительного сырья. Растительное сырье обрабатывают водным раствором формалина. Затем сырье выдерживают в подкисленной воде при pH 3,8-4,2 и 45-52°C для удаления кальциевых и магниевых мостиков. Затем осуществляют экстракцию пектиновых полисахаридов водным раствором оксалата аммония. Далее экстракт упаривают и обрабатывают 96%-ным

этиловым спиртом. Лиофильно высушивают. В качестве растительного сырья используют свежесобранные пресноводные цветковые растения, например любой вид рода ряски *Lemna* spp., или предварительно измельченную свежую надземную часть высших растений, содержащий пектиновые полисахариды, например смолевки обыкновенной *Oberna behen*(L) *Ikonn* (*Silene vulgaris* (Moench) Garke). Изобретение позволяет получить продукт с высоким выходом и высокой степенью очистки. 4 з.п.ф-лы, 2 табл.

RU 2 149 642 C1

RU 2 149 642 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 149 642** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 35/78, 31/715, A 61 P**
37/04

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 99117565/14, 09.08.1999
(24) Effective date for property rights: 09.08.1999
(46) Date of publication: 27.05.2000
(98) Mail address:
167610, g.Syktyvkar, ul. Kommunisticheskaja
24, KNTs UrO RAN, patentnyj otdel

(71) Applicant:
Institut fiziologii Komi nauchnogo tsentra
Ural'skogo otdelenija RAN
(72) Inventor: Ovodova R.G.,
Bushneva O.A., Golovchenko V.V., Popov
S.V., Ovodov Ju.S.
(73) Proprietor:
Institut fiziologii Komi nauchnogo tsentra
Ural'skogo otdelenija RAN

(54) **METHOD OF PREPARING POLYSACCHARIDES FROM PLANT RAW MATERIAL WITH IMMUNOSTIMULATING EFFECT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, chemical-pharmaceutical industry. SUBSTANCE: invention relates to method of preparing pectin polysaccharides from plant raw material. Plant raw material is treated with formalin aqueous solution, kept in acidified water at pH 3.8-4.2 and 45-52 C to remove calcium and magnesium bridges followed by extraction of pectin polysaccharides with ammonium oxalate aqueous solution. Then extract is

evaporated, treated with 96% ethyl alcohol and lyophilized. Fresh-water flower plants, for example, any species of duckweed genus (*Lemna* spp.) or preliminary milled fresh above ground part of higher plants containing pectin polysaccharides, for example, common campion *Oberna behen* (L.) Ikonn (*Silene vulgaris*, Moench Garke) are used as plant raw material. EFFECT: high yield and purification degree of product. 5 cl, 2 tbl, 4 ex

RU 2 149 642 C1

RU 2 149 642 C1

Изобретение относится к медицине, а именно к химико-фармацевтической промышленности, и касается способа получения пектиновых полисахаридов.

Наиболее близким к заявляемому является способ получения суммы полисахаридов, обладающей 5
противовоспалительной активностью [RU патент 2063236, мки А 61 К 35/76], заключающийся в экстракции травы и шрота василька синего после выделения суммы флавоноидов исчерпывающей экстракцией 10
80%-ным водным ацетоном при соотношении сырье : экстрагент 1:1-6, горячей водой при соотношении сырье : экстрагент 1: 15-20 соответственно в течение 40 - 50 мин с последующим упариванием, осаждением 15
96%-ным этиловым спиртом, фильтрованием и сушкой при температуре 70 - 75°C в сушильном шкафу.

Этот способ не позволяет выделить пектиновые полисахариды из растений. Кроме того, недостатком этого способа является 20
необходимость предварительной обработки сырья раствором ацетона, усложняющей исполнение способа и увеличивающей время его проведения, а также использование 25
высокотемпературного высушивания полисахарида, что приводит к снижению качества целевого продукта.

Задачей предлагаемого изобретения является разработка нового эффективного способа выделения пектиновых полисахаридов, обладающих 30
иммуностимулирующим действием, который позволяет получить целевой продукт высокого качества из высушенных растений.

Технический результат состоит в получении сумм пектиновых полисахаридов с выходом целевого продукта 4 - 5% от массы 35
растительного сырья пресноводного растения, например ряски, и с выходом 3 - 4% - для надземной части высшего растения, например, смолевки обыкновенной.

Технический результат достигается тем, что сырье обрабатывают водным раствором формалина для фиксации пигмента, затем сырье выдерживают в подкисленной воде для 40
удаления кальциевых и магниевых мостиков, после чего экстрагируют пектиновые полисахариды водным раствором оксалата аммония, в качестве сырья используют 45
свежесобранные пресноводные цветковые растения, например, ряску, или предварительно измельченную свежую надземную часть высших растений, содержащих пектиновые полисахариды, например, смолевки обыкновенной.

Существенные признаки изобретения:

Способ получения из растительного сырья суммы пектиновых полисахаридов, обладающих иммуностимулирующим 50
действием, в частности, стимулирующих фагоцитоз, включающий обработку сырья в водном растворе формалина для фиксации пигмента, выдерживание в подкисленной воде при соответствующих рН и температуре для 55
удаления кальциевых и магниевых мостиков с последующей экстракцией полисахаридов водным раствором оксалата аммония, обработкой экстракта известными способами и лиофильной сушкой целевого продукта, при этом в качестве сырья используют 60
свежесобранные пресноводные цветковые растения, например ряску, или

предварительно измельченную свежую надземную часть высших растений, содержащих пектиновые полисахариды, например, смолевки обыкновенной.

Способ опробован на примере высшего растения - смолевки обыкновенной, надземную часть которой предварительно 5
измельчают до 15-20 мм, и пресноводного высшего растения - ряски. Сырье предварительно обрабатывают 0,4 - 0,5% водным раствором формалина в соотношении сырье : раствор 1:8-11 в течение 12-14 ч для 10
фиксации пигмента при температуре 18 - 25 °С. Перед экстракцией сырье выдерживают в подкисленной соляной кислотой воде (рН 3,8 - 4,2; соотношение сырье : раствор 1:7-10) при 45 - 52°C в 15
течение 3-4 ч для удаления кальциевых и магниевых мостиков. Экстракцию пектиновых полисахаридов проводят водным 0,5 - 0,7% раствором оксалата аммония в соотношении 1:8-12 при 65 - 70°C 3-8 ч. Далее экстракт 20
концентрируют, осаждают 96%-ным этанолом в соотношении экстракт: спирт 1:3-4, фильтруют, диализуют и лиофильно высушивают.

Пример 1. 2,4 кг свежесобранной надземной части смолевки обыкновенной, измельченной до 15-20 мм, заливают 0,5%-ным водным раствором формалина (24 л) и оставляют при комнатной температуре в течение 14 часов. Потемневший раствор сливают, сырье промывают водой до 30
бесцветной окраски, отжимают и заливают водой, подкисленной соляной кислотой (рН 4,0; 18 л). Смесь выдерживают при температуре 50°C в течение 3 ч. Далее раствор сливают, сырье промывают водой и заливают 0,7%-ным водным раствором оксалата аммония (30 л). Экстракцию полисахарида проводят при температуре 35
68-70°C в течение 6 ч при регулярном перемешивании. Экстракт концентрируют до 1,5 л упариванием в вакууме при температуре 40
40 - 45°C. Полисахарид осаждают из экстракта 4-кратным объемом 96%-ного этанола, отделяют центрифугированием, растворяют в воде и диализуют против дистиллированной воды. Очищенный раствор полисахарида высушивают лиофильно. 45
Выход продукта 2,7% (табл. 1).

Пример 2. 2,4 кг свежесобранной надземной части смолевки обыкновенной заливают 24 л 0,5%-ного раствора формалина. Далее обработку осуществляют, как описано в примере 1. Сырье заливают 50
подкисленной водой (рН 4,0; 18 л). Полисахарид последовательно экстрагируют 0,7%-ным раствором оксалата аммония (24 л), затем 1%-ным раствором (24 л) при тех же условиях. Объединив экстракт, его 55
концентрируют в вакууме до 2 л. Выход продукта 3%.

Увеличение объема раствора оксалата аммония не приводит к значительному увеличению выхода целевого продукта, поэтому достаточно одной обработки сырья экстрагентом при соответствующих 60
соотношениях.

Пример 3. 3,4 кг свежесобранной ряски заливают 22 л 0,5%-ного раствора формалина. Далее обработку осуществляют, как описано в примере 1. Сырье заливают подкисленной водой (рН 4,0; 15 л).

Полисахарид экстрагируют 0,5%-ным раствором оксалата аммония (40 л). Экстракт концентрируют в вакууме до 2 л. Выход продукта 4%.

Пример 4. 3,4 кг свежесобранной ряски заливают 22 л 0,5%-ного раствора формалина. Далее обработку осуществляют, как описано в примере 1. Сырье заливают подкисленной водой (рН 4,0; 15 л). Полисахарид экстрагируют 0,7%-ным водным раствором оксалата аммония (40 л). Экстракт концентрируют в вакууме до 2 л. Выход продукта 5% (табл. 1).

Характеристика целевых продуктов приведена в табл. 1.

Изучение влияния на фагоцитоз полисахаридов из травы смолевки обыкновенной и ряски, выделение которых описано в предлагаемом способе, показало, что изучаемые вещества в концентрациях 1-15 мкг/мл увеличивают фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови человека, а также макрофагов брюшной полости крыс (табл. 2). Пектиновые полисахариды смолевки стимулируют также переваривающую способность фагоцитов, оцененную по активности внеклеточной миелопероксидазы. Определение полулетальной дозы ЛД₅₀ при однократном внутрибрюшинном введении мышам показало, что выделенные целевые продукты являются практически нетоксичными соединениями.

В табл. 2 представлены результаты стимуляции фагоцитоза пектиновыми полисахаридами из травы смолевки обыкновенной и ряски.

Таким образом, предлагаемое изобретение позволяет выделить из растений рода ряски и смолевки обыкновенной пектиновые полисахариды, обладающие иммуностимулирующим действием, с достаточно высокой степенью очистки целевых продуктов. Способ может быть

использован для любых высших растений, содержащих пектиновые полисахариды.

Формула изобретения:

5 1. Способ получения полисахаридов из растительного сырья путем экстракции, упаривания, отличающийся тем, что исходное сырье предварительно обрабатывают водным раствором формалина, выдерживают в подкисленной воде при рН 3,8 - 4,2 и 45 - 52 °С, экстракцию пектиновых полисахаридов осуществляют водным раствором оксалата аммония, экстракт упаривают, полисахариды осаждают 96%-ным этиловым спиртом, сушку целевого продукта ведут лиофильно, при этом в качестве сырья используют свежесобранное пресноводное цветковое растение, например любой вид рода ряски *Lemna* spp., или предварительно измельченную свежую надземную часть высших растений, содержащих пектиновые полисахариды, например смолевки обыкновенной *Oberna behen*(L) *Ikonn* (*Silene vulgaris* (Moench) Garke).

15 2. Способ по п.1, отличающийся тем, что сырье обрабатывают 0,4 - 0,6%-ным раствором формалина при соотношении сырье : раствор 1: (8 - 11) в течение 12 - 14 ч при 18 - 25°С.

25 3. Способ по п.1, отличающийся тем, что обработку растительного сырья в подкисленной воде ведут при периодическом перемешивании, при этом сырье : раствор берут при соотношении 1: (7 - 9), процесс проводят в течение 3 - 4 ч.

30 4. Способ по п.3, отличающийся тем, что подкисленную воду получают путем добавления соляной кислоты.

35 5. Способ по п.1, отличающийся тем, что экстракцию полисахаридов осуществляют 0,5 - 1%-ным раствором оксалата аммония при соотношении сырье : раствор 1 : (8 - 12) соответственно при 65 - 70°С в течение 3 - 8 ч.

40

45

50

55

60

Таблица 1

Сырье	Выход, %	Общее содержание, %	
		белков	галактуроновой кислоты
трава смолевки	3	12	62 - 67
ряска	5	0.5	60 - 68

RU 2149642 C1

RU 2149642 C1

Таблица 2

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ СУММЫ ПОЛИСАХАРИДОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИМ ДЕЙСТВИЕМ

Целевой продукт	Концентрация, мкг/мл	Фагоцитарный показатель, %		Миелопероксидазная активность, $OD_{492} \times 1000$		Полулетальная доза LD_{50} , мг/кг
		нейтрофилы	макрофаги	нейтрофилы	макрофаги	
Контроль	-	62 ± 4	36 ± 3	967 ± 26	711 ± 48	-
из травы смолевки	15	$88 \pm 8^{***}$	$55 \pm 5^{***}$	1062 ± 102	$994 \pm 93^{***}$	>1000
из ряски	1	$71 \pm 4^{**}$	$60 \pm 6^{**}$	$1087 \pm 78^{**}$	795 ± 86	890

Примечания: данные представлены в виде среднего арифметического значения \pm стандартное отклонение при $n = 7$, OD_{492} - оптическая плотность при 492 нм,

*** - различия достоверны при $p < 0.001$, ** - при $p < 0.01$.