

Рекомендована д.ф.н., професором О.Х.Піміновим

УДК 615.36.36:616-089.87

ОПТИМІЗАЦІЯ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА НОВОГО ПРЕПАРАТУ “АМПЕВІТ”

І.С.Безверха, В.Г.Западнюк, О.І.Тихонов, В.А.Циганкова

Інститут геронтології АМН України

Українська фармацевтична академія

Науково обгрунтована технологія одержання субстанції нового препарату “Ампевіт” з антианемічною та гепатопротекторною дією. За допомогою сучасних аналітичних методів вивчений його склад та фізико-хімічні властивості.

В умовах дефіциту вискоєфективних лікарських засобів антианемічної та гепатопротекторної дії вітчизняного виробництва ефективний пошук нових джерел одержання біологічно активних речовин для використання в гематології та гастроентерології є важливою і надзвичайно актуальною проблемою медицини України.

Із загального асортименту препаратів, які виявляють таку фармакологічну активність, використовуються препарати як синтетичного, так і природного походження. Але найбільш прогресивним напрямком розвитку сучасної медицини є створення і використання саме натуральних препаратів на основі природної сировини.

Відомо, що високу антианемічну та гепатопротекторну активність виявляють білкові гідролізати [5]. Фармакологічний ефект цих препаратів можна пояснити високим вмістом амінокислот (які використовуються для біосинтезу білка, що йде на забезпечення основних пластичних потреб організму), а також набором макро- та мікроелементів і вітамінів. Найбільш відомі в Україні антианемічні препарати, одержані з печінки великої рогатої худоби, “Вігератин” (Белмедпрепарати), “Сірепар” (фірма “Гедеон Ріхтер”, Угорщина), “Вітогепат” (Белмедпрепарати).

Обмежене застосування препаратів для парентерального живлення (“Вітогепат”, “Сірепар”) пояснюється незручністю введення та можливістю випадків анафілактичного шоку.

В інституті геронтології АМН України в лабораторії фармакології експериментально і клінічно вивчений комплексний препарат з печінки “Ампевіт”. Препарат поєднує в своєму складі як

гідролізат, так і екстракт печінки великої рогатої худоби, через що він і відрізняється від аналогів [2]. На відміну від білкових гідролізатів для парентерального живлення ампевіт не має побічної дії, він призначається для орального введення, що значно спрощує спосіб його застосування. Ампевіт містить всі необхідні для організму людини амінокислоти, пептиди, вітаміни (В₁, В₂, В₆, В₁₂), макро- та мікроелементи (К, Na, Mg, Zn, Cu, Co, Fe, Mn), фолієву, нікотину, аскорбінову кислоти [3]. В медичній практиці він зарекомендував себе, як вискоєфективний гепатопротектор та антианемічний препарат. Передбачається його використання в педіатричній та геріатричній практиці.

Експериментальна частина

В основі технології майже всіх відомих амінокислотних гідролізатів лежить хімічний спосіб гідролізу — кислотно-лужний. Але при такому виробництві препаратів спостерігаються небажані ефекти (процеси рацемізації амінокислот, порушення активності вітамінів та ін.).

Нами розроблена і запропонована альтернативна технологія водної екстракції та ферментативного гідролізу панкреатином, яка дозволяє уникнути цих недоліків [4]. Технологічний процес проведення ферментативного гідролізу складається з 3-х стадій:

1) 2-о кратна водна екстракція біологічно активних речовин з подрібненої сировини (печінки великої рогатої худоби) при 90–95 · С протягом 1 год. і фільтрація екстракту;

2) 2-о кратний ферментативний гідроліз сировини 2% розчином панкреатину при 40–50 · С. Після кожної обробки сировини необхідно проводити інактивацію ферменту при 90 · С протягом 45 хв., а гідролізат відокремлювати фільтрацією;

3) Поєднання екстрактів і гідролізатів та висушування субстанції за допомогою розпилювальної сушарки.

В результаті експериментальних досліджень була виявлена динаміка переходу в екстракти і

гідролізати азотистих та мінеральних речовин і вітамінів на різних етапах технології ферментативного гідролізу.

При вивченні умов екстракції було встановлено, що максимальний вихід (до 90%) всіх біологічно активних речовин із сировини в екстракт і гідролізат досягається при 1-й та 2-й обробці ферментативним препаратом. Двократною екстракцією і гідролізом досягається розщеплення білків печінки до амінокислот та пептидів. Після третього гідролізу накопичення амінокислот в розчині практично не відбувається. Цікава закономірність спостерігається при аналізі даних вмісту фракцій азоту на різних етапах технологічної схеми.

Вміст білкового азоту послідовно знижується з 95,6% у вихідній сировині до 9,5% в другому гідролізаті. Кількість поліпептидного азоту змінюється таким чином: після першої екстракції його вміст по відношенню до загального азоту збільшується на 20%, після другої він становить 45%. В першому гідролізаті його вміст не збільшується, а в другому він стає найбільшим і досягає 54,6%. Після цього відмічалось поступове зниження цього показника при одночасному збільшенні вмісту вільних амінокислот до 33,6% (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст фракцій азоту у відсотках по відношенню до загального азоту

Показники	Печінка	Гідролізати, субстанція
Білковий	95,6	9,5
Поліпептидний	2,6	54,6
Вільних амінокислот	1,4	33,6

Азот фракції поліпептидів визначали як різницю між фракцією азоту, не осадженого трихлороцтовою кислотою, і фракцією азоту, не осадженого фосфорномолібденовою кислотою. Білковий азот розраховували за різницею між загальним азотом і фракцією азоту, не осадженого трихлороцтовою кислотою [6]. Загальний амінокислотний склад ампевіту визначали на автоматичному аналізаторі фірми "Бекман" марки "Уніхром". Одержані дані наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Амінокислотний склад ампевіту

Амінокислоти	Вміст у відсотках по відношенню до білка
Триптофан	1,47
Лізин	8,18
Гістидин	2,02
Аргінін	5,23
Аспарагінова кислота	6,23

Треонін	3,93
Цистин	2,00
Валін	4,90
Метионін	3,70
Ізолейцин	5,90
Лейцин	9,70
Тирозин	3,52
Фенілаланін	4,99
Оксипролін	1,80
Серин	3,98
Глутамінова кислота	9,50
Пролін	6,10
Гліцин	6,30
Аланін	6,20

Крім азотутримуючих речовин ампевіт містить значну кількість життєво необхідних мінеральних елементів, визначених за методом емісійного спектрального аналізу [1] на кварцевому спектрографі ІСП-30 (табл. 3).

Таблиця 3

Мінеральний склад ампевіту

Мінеральні речовини	Вміст, мг/100 г
Кальцій	7,2
Магній	7,8
Залізо	7,4
Цинк	0,50
Алюміній	0,19
Марганець	0,50
Мідь	7,2
Молібден	0,14
Хром	0,01
Титан	0,02
Олово	0,004

Електрофоретичний аналіз препарату "Ампевіт" проводили за модифікованим методом Лемлі, який широко застосовується для аналізу білків з різних джерел [7]. Суть модифікації полягала у застосуванні градієнта концентрації поліакриламідного гелю (25-30%), який збільшує вирішальну здатність методу.

Препарат розчиняли в буфері Лемлі (50 мг/мл), який містив 0,0625 М трис-НCl, з рН 6,8; 5% в-меркаптоетанол; 2% SDS (натрій додецилсульфат); 0,001% бромфенолового синього. Потім прогрівали 5 хв. на киплячій водяній бані, додавали гліцерин до 10% і вносили в лунки (ямки) гелю. В ролі маркерів використовували ко-

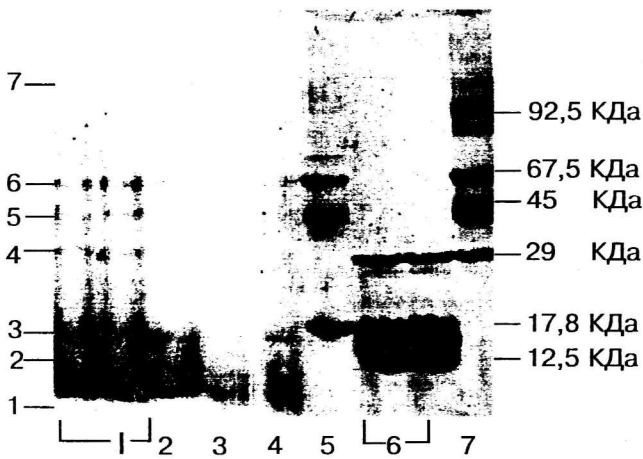


Рис. 1. SDS електрофорез препарату "Ампевіт" в градієнті (25-30%) поліакриламідного гелю. 1-4 — препарат "Ампевіт", різні концентрації; 5-7 — маркери молекулярної маси.

мерційні стандартні препарати білків фірми "Серва" (Німеччина): цитохром С — 12,5 кДа, міоглобін — 17,8 кДа, карбоангідразу — 29 кДа, овальбумін — 45 кДа, сироватковий альбумін — 67,5 кДа, фосфорилазу — 92,5 кДа. Електрофорез проводили протягом 18 год. при 15 МА. Після закінчення електрофорезу гель фіксували в суміші етанол:вода:оцтова кислота (30:30:10), фарбували протягом 1 год. в 0,25% Кумасі Y-250 і знебарвлювали в 7% оцтової кислоти. Калібрувальну криву для визначення молекулярних мас будували в напівлогарифмічній системі координат за rF (відносна рухомість).

Результати

На рис. 1 зображена електрофореграма препарату "Ампевіт", з якої видно, що до складу препарату входить цілий ряд (щонайменше 8) поліпептидів різної молекулярної маси. Основна маса препарату представлена поліпептидами з рухомістю в зоні міоглобіну та цитохрому С (1, 2, 3). Найменше представлені білки, які за рухомістю відповідають карбоангідразі овальбуміну та сироватковому альбуміну (4-6). В дуже незнач-

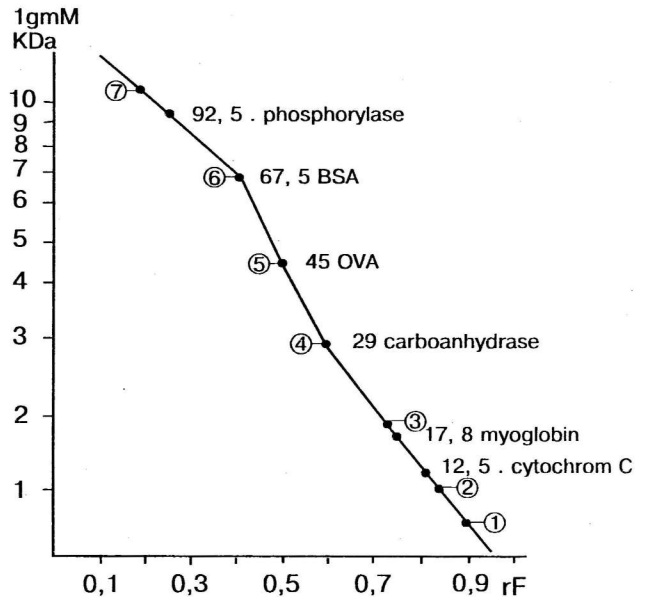


Рис. 2. Калібрувальна крива для визначення молекулярної маси досліджуваних білків.

них кількостях (помітних при перевантаженні доріжки) — високомолекулярні поліпептиди (7).

На рис. 2 зображена калібрувальна крива для розрахунку молекулярних мас досліджених білків. Як видно з кривої, мажорний триплет поліпептидів препарату "Ампевіт" (1-3) представлений білками з молекулярною масою від 9 до 18 кДа, в зонах 4-6 — відповідно 29,45 та 67,5 кДа. Мінорний компонент препарату (7) представлений двома високомолекулярними білками, молекулярна маса яких складає більше 100 кДа.

ВИСНОВКИ

1. На основі експериментальних досліджень науково обґрунтована технологія виробництва субстанції нового антианемічного та гепатопротекторного препарату "Ампевіт".

2. Досліджені фізико-хімічні показники, опрацьовані методи кількісного визначення біологічно активних речовин (амінокислот, пептидів, вітамінів, мікроелементів) на основі сучасних методів аналізу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аналитические методы белковой химии: Пер. с англ./ Под ред. В.Н.Ореховича. — М.: Изд-во иностранной литературы, 1963. — 465 с.
2. Безверхая И.С. Фармакологическая оценка эффективности препарата "Ампевит" в опытах на животных разного возраста: Автореф. дис....канд.мед.наук. — К., 1972. — 26 с.
3. Западнюк В.И.// Респ. межвед. сб.: Микроэлементы в сельском хозяйстве и медицине. — К.: Наукова думка, 1969. — 149 с.
4. Западнюк В.И., Безверхая И.С., Цыганкова В.А., Евсеева Р.Н.// Тез. докл. Всеукраинской научно-технической конференции "Проблеми розробки та використання лікарських засобів" (4-8 жовт. 1993, М. — Одеса) — Харьков, 1993. — С. 31-237.

5. Западнюк В.И., Купраш Л.П., Заика Л.У., Безверхая И.С. *Аминокислоты в медицине.* — К.: Здоров'я, 1982. — 200 с.
6. *Экспериментальные методы исследования белков и нуклеиновых кислот/ Под ред. М.А.Прокофьева.* — М.: Изд-во МГУ. — 1985. — 28 с.
7. Laemly U.K. *Nature.* — 1970. — 227. — №5259. — P. 680-685.

УДК 615.36.36:616-089.87

**ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА
НОВОГО ПРЕПАРАТА “АМПЕВИТ”**

И.С.Безверхая, В.Г.Западнюк, О.И.Тихонов, В.А.Цыганкова

Научно обоснована технология получения субстанции нового препарата “Ампевит”, обладающего антианемическим и гепатопротекторным действием. С помощью современных аналитических методов изучен его состав и физико-химические свойства.

UDC 615.36.36:616-089.87

**OPTIMIZATION TECHNOLOGY OF PRODUCTION OF
NEW PREPARAT “AMPEVIT”**

I.S.Bezvyerkhaya, V.G.Zapadnyuk, O.I.Tikhonov, V.A.Tsigankova

It is scientifically grounded the technology of receiving of substance new preparat “Ampevit”, which is remarkable with antianaemic and haepatoprotectiv activity. With help of modern analytical methods it was studied the structure and physico-chemical properties of this preparat.

ДОВІДНИК ВФ

**ДИКОРОСТУЧІ ТА КУЛЬТИВУЄМІ ЛІКАРСЬКІ РОСЛИНИ, ЇХ ДІАГНОСТИКА
І ЗАСТОСУВАННЯ — Х.: Друкарня Книжкової палати України, 1991.**

Л.М.Городнянська, А.Г.Сербін, Н.М.Ткаченко, Л.С.Картмазова, Л.А.Гаєвська,
О.П.Хворост, В.П.Руденко, М.Ф.Ткаченко

Довідник містить вичерпні рекомендації з діагностики найбільш популярних дикоростучих і культивуємих лікарських рослин, а також їх заготовки та застосування. В загальній частині викладені методи визначення тотожності рослинної сировини, принципи її раціональної заготовки. В спеціальній частині в доступній формі описані морфолого-анатомічні діагностичні ознаки рослин і домішок з використанням 221 рисунка їх зовнішньої та внутрішньої будови.