

УДК 612.411: 547.553:591.582

Грабовський С. С., доцент, к.б.н. (grbss@ukr.net),**Драчук У.Р.**, асистент, к.т.н.,**Лозинський О.М., Кравець І.І.**, ТзОВ «І.Т.М.»[©]*Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Гжицького*

ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН СЕЛЕЗІНКИ (ПОЛІАМІНІВ) З ВИКОРИСТАННЯМ ПРИСТРОЮ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ЕКСТРАГУВАННЯ

У статті розглянуто метод екстрагування поліамінів (путресцину, сперміну та спермідину) із селезінки з використанням ультразвукового пристрою. Проаналізовано доцільність використання ультразвуку при одержанні біологічно активних речовин та їх подальшого використання у годівлі сільськогосподарських тварин та птиці.

Ключові слова: поліаміни, селезінка, екстракція, ультразвук

Вступ. Поряд із розвитком виробництва синтетичних лікарських засобів сьогодні актуальним питанням є одержання біологічно активних речовин з природної сировини рослинного чи тваринного походження з використанням екстрагування [1–5]. При цьому широко застосовується ультразвук, що, як правило, не тільки значно пришвидшує у часі сам процес екстрагування, але й призводить до збільшення виходу основного продукту. Крім того помічено, що ультразвук надає екстрактам, емульсіям та суспензіям стерильності [6–8]. Значний інтерес викликають біологічно активні речовини, одержані із селезінки шляхом екстрагування [9–13]. У літературі є ряд досліджень, пов'язаних з виділенням поліамінів (путресцину, сперміну та спермідину) із селезінки [14, 15].

Матеріал і методи. Визначення вмісту поліамінів у біологічному матеріалі проводили методом рідинної хроматографії високого тиску (РХВТ) на рідинному хроматографі Agilent 1200 (США) [16].

Підготовка зразків. 1 кг селезінки (якщо заморожена — розморожують) витримують за температури +4 °С п'ять–шість днів, зачищають і подрібнюють у м'ясорубці. Подрібнену селезінку заливають 2 л дихлоретану в герметичному посуді та перемішують вісім днів за температури +18 °С. Перші чотири години екстракцію проводять при безперервному перемішуванні, потім перемішують безперервно 15 хв щогодини.

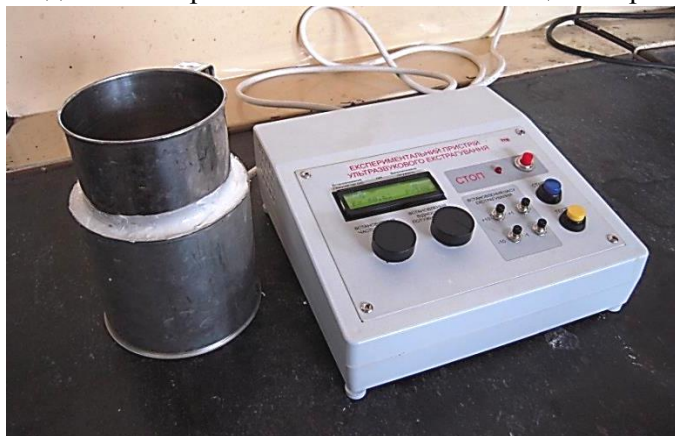
На восьму добу екстракт проціджують через грибок 6–8 шарів марлі і відганяють дихлоретан за температури +45 °С під вакуумом (640 мм. рт. ст.) до повного видалення.

Екстракт підігрівують в емальованому посуді за температури $+40^{\circ}\text{C}$ і додають 70° спирту [17]. Додавали 1 М розчин хлорної кислоти та залишали на добу у холодильнику. Після цього зразки центрифугували 30 хв при 16000 g. З усіх проб відбирали надосадову фракцію та додавали до кожного зразка по 300 мкл діетилового ефіру. Інтенсивно перемішували та центрифугували 30 хв при 16000 g. Для подальшої роботи відбирали по 300 мкл кислотної фракції. До відібраної аліквоти додавали насичений розчин карбонату натрію з розрахунку 25 мкл карбонату на 100 мкл кислоти. Після цього до кожного зразка додавали по 0,4 мкл розчину 5-диметиламіно-1-нафталін-сульфоніл хлориду (Serva, США) в ацетоні у концентрації 5 мг/мл. Залишали зразки на 20 год за кімнатної температури у темному місці для дансильовання поліамінів. Потім до зразків додавали по 400 мкл циклогексану та інтенсивно перемішували для екстракції дансильованих поліамінів, центрифугували 10 хв при 16000 g.

Відбирали фракцію циклогексану та переносили її у тиглі для вакуумного сушіння. Процедуру із циклогексаном повторювали тричі. Циклогексанові фракції висушували у вакуумній сушарці за кімнатної температури у темряві. Осад, що залишився, розчиняли в 400 мкл метанолу та фільтрували через фільтр PTFE-25-2 фірми Supelco з розмірами пор 0,2 мкм. Після цього проводили аналіз зразків на хроматографі.

Приготування стандарту. Як стандарт застосовували еквімолярну суміш стандартних поліамінів (путресцин·2HCl, спермідин·3HCl, спермін·4HCl, N1- та N8-ацетилспермідин, ацетилпутресцин, N1-ацетилспермін) із розрахунку 25 пмоль на пробу. Суміш стандартів, попередньо розчинену в 1 М перхлорній кислоті, готували аналогічно дослідним зразкам. У роботі використовували розчинники та стандарти поліамінів фірми SigmaChemicalCo. (St. Louis, MO).

Аналіз зразків. Для аналізу використовували колонку Daisopak SP-120-5-ODS-RPS (4,6 mm I.D. Ч 250 mm) фірми Daisoco. Ltd. Аналізували аліквоти по 20 мкл кожного зразка в градієнті концентрації вода/ацетонітрил від 50 до 100 % протягом 20 хв та чистий ацетонітрил 5 хв при швидкості потоку 1



мл/хв. Рівень поліамінів визначали при довжині хвилі опромінювання 342 нм та емісії 512 нм. Рівень поліамінів розраховували у наномолях на 1 мг білка тканини. Нами було розроблено експериментальний пристрій ультразвукового екстрагування, який дає акустичну потужність 100 Вт і працює у діапазоні

37–40 кГц. Резонансна чистота залежить від об'єму і густини речовини, що використовується. Була проведена додаткова обробка селезінки ультразвуком протягом 3 та 5 хв на першому, третьому та восьмому дні екстрагування.

Результати та їх обговорення. Проведені дослідження показали, що при використанні ультразвуку концентрація загальної кількості поліамінів достовірно зросла у порівнянні з контролем на третій та восьмий день екстрагування ($P \leq 0,05-0,001$). Така ж закономірність спостерігається за концентрацією путресцину.

Різниця при обробці ультразвуком селезінки з дихлоретаном тривалістю 3 та 5 хв була незначною. Спостерігалась більша концентрація поліамінів на восьмий день порівняно з третім днем при обробці ультразвуком протягом 5 хв.

Таблиця 1

Концентрація поліамінів в залежності від часу екстрагування та при використанні ультразвукового приладу ($M \pm m$, $n=3$)

Субстрати та час обробки ультразвуком	3 хв ультразвук на 1-ий день	5 хв ультразвук на 1-ий день	3 хв ультразвук на 3-ій день	3 хв ультразвук на 8-ий день	контроль
Путресцин	$4,72 \pm 0,061$	$4,973 \pm 0,037$	$7,823 \pm 0,055$	$8,476 \pm 0,022^*$	$7,410 \pm 0,013^*$
Спермідин	$0,423 \pm 0,004$	$0,315 \pm 0,004$	$0,321 \pm 0,007$	$0,245 \pm 0,005$	$0,284 \pm 0,005$
Спермін	$0,296 \pm 0,028$	$0,146 \pm 0,029$	$0,180 \pm 0,065$	$0,149 \pm 0,037$	$0,152 \pm 0,007$
Загальна кількість поліамінів	$5,44 \pm 0,46$	$5,43 \pm 0,015$	$8,323 \pm 0,025$	$8,87 \pm 0,026^*$	$7,84 \pm 0,015^*$

Примітка.*— різниця достовірна відносно контролю ($P \leq 0,05-0,001$)

У звуковому і низькоультразвуковому діапазоні, що охоплює межі від 10 до 50 кГц, проявляються такі фізико-хімічні явища, як: акустична кавітація, інтенсивне перемішування, перемінний рух частин, інтенсифікація масообмінних процесів.

При цьому утворюються суспензії, емульсії та проходить селективне руйнування клітин і мікроорганізмів у суспензіях [18]. Такий діапазон не призводить до змін у структурі речовин, до дії на клітинному і субклітинному рівні, до електронного збудження та до магнітного і електроакустичного ефекту.

Висновки.

Результати наших досліджень доцільно застосовувати для одержання біологічно активних речовин з метою скорочення часу екстракції та проведення стерилізації отримуваної сировини. Одержані таким шляхом препарати — перспективно використовувати для внутрішнього застосування.

Водночас подальші дослідження слід направити на вивчення впливу ультразвукових коливань на селективність отримання компонентів при екстрагуванні.

Література

1. Залеток С. П. Вміст поліамінів та активність орнітин-декарбоксилази в пухлинних тканинах та фізіологічних рідинах хворих на новоутворення грудної

залози / С. П. Залеток, Н. К. Бердинських, Н. М. Лялюшко та ін. // Гези X з'їзду онкологів України. — Ялта, 2001. — С. 39.

2. Зуева Е. П. Экспериментальное изучение противоязвенных свойств экстракта корыюсины / Е. П. Зуева, С. Г. Крылова, В. Ф. Турецкова и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 1997. — Т. 60. — С. 38–41.

3. Артюков А. А., Козловская Э. П., Попов А. М. Композиция для коррекции патологических нарушений углеводного, липидного обмена и антиоксидантного статуса организма. — Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. — Описане изобретения к патенту Ru (11) 2360683 (13) С1 // Тихоокеанский институт биоорганической химии дальневосточного отделения Российской Академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU).

4. Valachovic P., Towards the industrial production of medicinal tincture by ultra sound assisted extraction / P. Valachovic, A. Pechova, T. J. Mason // Ultrasonics Sonochemistry. — 8 (2001) 111–117.

5. Кленов О. О. Вплив споживання тваринами соєвих продуктів із різним вмістом біологічно активних речовин (поліфенолів) на рівень білка орнітіндекарбоксилази та вміст поліамінів в експериментальних пухлинах / О. О. Кленов // Фармакологія та лікарська токсикологія. — 2012. — № 2 (27). — С. 37–43.

6. Вернигора П. Ф. Методы ультразвуковой дезинтеграции в микробиологических исследованиях / П. Ф. Вернигора, Н. К. Литвинова, Е. П. Москаленко. — Акуст. журнал. — 1975. — т. 21. — № 2. — С. 316–317.

7. Москаленко Е. П. Проблемы ультразвуковой дезинтеграции в микробиологии. — В кн. : Ультразвук в физиологии и медицине. — Ульяновск, 1975. — Ч. 1. — С. 21–26.

8. Шмакотина З. В. Возможность применения ультразвука для стерилизации лечебно-профилактических сывороточных препаратов / З. В. Шмакотина, Л. Н. Юхимеяко, О. И. Белинская. — В кн. : Ультразвук в физиологии и медицине. — Ростов н/Д, 1972. — Т. 1. — С. 3–114.

9. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of activity in multitest systems in vitro / Wen Huang, An Xue, Hai Niu, Zhen Jia, Jiawen Wang. — Food Chemistry. — 2009. — V. 114, Issue 3. — P. 1147–1154.

10. Sheng-Huanq. Exstection of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and immune enhancement activity / Sheng-Huanq, Zheng-xiang Ning // International Journal of Biological Macromolecules. — 2010. — V. 47. — Issue 3. — P. 336–341.

11. Xinlin Wei. Composition and bioactivity of tea flower polysaccharides obtained by different methods / Xinlin Wei, Miaoai Chen, Jianbo Xiao, Ying Liu, Lan Yu, Hua Zhang, Yuanfeng, Yuanfeng Wang // Carbohydrate Polymers. — 2010 — V. 79. — Issue 2. — P. 418–422.

12. Ruizhan Chen. Ultrasound complex enzymes assisted extraction and biochemical activities of polysaccharides from *Epimedium* leaves / Ruizhan Chen,

Shizhe Li, Chunming Liu, Simin Yang, Xiniong Li // *Process Biochemistry*. —2012. — V. 47. — Issue 12. — P. 2040–2040.

13. Ruizhan Chen. Optimization of ultrasonic extraction process of polysaccharides from *Ornithogalum Ait* and evaluation of its biological activities /Ruizhan Chen, Yuan Li, Hang Dong, Zhiqiang Liu, Shizhe Li, Xiniong Li // *Ultrasonics Sonochemistry*. —2012. — V. 19. — Issue 6. — P. 1160–1168.

14. M. Kozova. Biological active polyamines in pig kidneys and spleen: Content after slaughter and changes during cold storage and cooking / M. Kozova, P. Kalac, T. Pelikanova// *Meat Science*. — 2008. — V. 79. — Issue 2. — P. — 326–331.

15. Rakesh Minocha. A Rapid and Reliable Procedure for Extraction of Cellular Polyamines and Inorganic Ions from Plant Tissues /Rakesh Minocha, Walter C. Shortle, Stephanie L. Long, and Subhash C. Minocha. —*J. Plant Growth Regul.* — 1994. — 13:187–193.

16. Gerbaut L. Determination of Erythrocytic Polyamines by Reversed-Phase Liquid Chromatography / L. Gerbaut // *Clin. Chem.* — 1991. — V. 37. — № 12. — P. 2117–2120.

17. Гуров В. А. Справочник по производству органопрепаратов /В. А. Гуров, М. А. Иноземцева, А. Б. Замиховский// *Пищевая промышленность*. — М., 1970. — С. 148–150.

18. Молчанов Г. И. Ультразвук в фармации (состояние и перспективы применения). — М. : Медицина, 1980. — 176 с.

Summary

S. S. Grabovskyi, Drachuk U.R, O.M. Lozinskyi, I.I. Kravets
A RECEIPT BIOLOGICALLY OF ACTIVE MATTERS OF SPLEEN
(POLIAMINIV) WITH THE USE OF DEVICE OF ULTRASONIC
EXTRACTING

In the article is considered method of extracting of polyamines (putrescin, spermine and spermidin) from a spleen with the use of ultrasonic device. Expedience of the use an ultrasound is analysed at a receipt biological of active matters and the method is used in feeding of agricultural zoos and birds.

Keywords: *polyamines, spleen, extraction, ultrasound*

Рецензент – д.вет.н., профессор Стибель В.В.