



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 119038

(13) C2

(51) МПК

A23L 33/105 (2016.01)

A61K 36/31 (2006.01)

A61K 36/06 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

B01D 11/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21)	Номер заявки:	а 2015 11131	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 35846 U, 10.10.2008 Черно Н. Фенольные вещества семян рапса: состав и антилиполитическая активность / Н. Черно, Г. Крусир, В. Мочуляк // Хранительна наука, техника и технологии 2007: научни трудове на УХТ: науч. конф. с Междунар. участие, Пловдив, 19-20 окт. 2007 г. - Пловдив, 2007. - Т. LIV. Св. 1. - С. 264-268 UA 107173 C2, 25.11.2014 UA 85872 U, 10.12.2013 Яшкина В. Биологически активная добавка - ингибитор панкреатической липазы / В. Яшкина, Г. Крусир // Хранительна наука, техника и технологии 2009: научни трудове на УХТ: научна конф. с Междунар. участие, Пловдив, 23-24 окт. 2009 г. - Пловдив, 2009. - Т. LVI. Св.1. - С. 485-490 UA 26164 U, 10.09.2007 UA 26209 U, 10.09.2007 Гураль Л. С. Склад та функціонально-фізіологічні властивості біополімерного комплексу печериць / Л. С. Гураль, Н. К. Черно, О. В. Нікітіна // Харчова наука і технологія. - 2011. - №. 1. - С. 31-35 Cherno N. Food supplement with the adaptogenic activity on the basic of Agaricus bisporus biopolymers / N. Cherno, L. Shafran, S. Osolina, O. Tretyakova, O. Nikitina // Ukrainian Food Journal. - 2014. - P. 577-586
(22)	Дата подання заявки:	12.11.2015		
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.04.2019		
(41)	Публікація відомостей про заявку:	25.05.2017, Бюл.№ 10		
(46)	Публікація відомостей про видачу патенту:	25.04.2019, Бюл.№ 8		
(72)	Винахідник(и): Черно Наталія Кирилівна (UA), Озоліна Софія Олександрівна (UA), Нікітіна Олександра Валеріївна (UA)			
(73)	Власник(и): ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)			

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ДІЄТИЧНОЇ ДОБАВКИ З АНТИЛІПОЛІТИЧНОЮ ДІЄЮ**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу одержання дієтичної добавки з антиліполітичною дією, що передбачає одержання фенольних сполук з насіння ріпаку, обробку біополімерного комплексу водним розчином фенольних сполук і сушіння, в якому для одержання фенольних сполук насіння ріпаку подрібнюють, знежирюють гексаном і висушують до повного вилучення розчинника, а висушену масу піддають 2-4-кратному екстрагуванню 90-96 % етанолом з центрифугуванням, супернатанти об'єднують і випаровують до повного вилучення розчинника. Після чого для одержання біополімерного комплексу подрібнені печериці заливають 0,9-1,1 % розчином гідроксиду натрію і витримують при 75-80 °С протягом 30-60 хв і гідромодулі 1-2,

UA 119038 C2

одержану суміш центрифугують, до осаду, що утворився, додають 6,9-7,1 % водний розчин гідроксиду натрію, витримують 255-265 хв при 95-98 °С і гідромодулі 1-2, суміш центрифугують, осад, що утворився, промивають водою до нейтрального значення рН промивних вод і центрифугують. Отриманий таким чином біополімерний комплекс висушують, змішують з водним розчином отриманих фенольних сполук при співвідношенні фенольні сполуки:біополімерний комплекс (9,5-11,5):(88,5-90,5), витримують при температурі 20-25 °С протягом 20-30 хв і висушують до постійної маси.

Винахід належить до біотехнології, зокрема до способу одержання на основі біополімерного комплексу печериці двоспорової (*Agaricus bisporus*) дієтичної добавки з антиліполітичною активністю.

Останні десятиліття ознаменувалися стрімким зростанням кількості захворювань, що виникають внаслідок порушення метаболізму ліпідів. Для корекції таких станів доцільним є використання препаратів, що знижують засвоєння організмом жирів. Їхнє застосування сприятиме боротьбі з ожирінням і, як наслідок, зниженню ризику розвитку ряду пов'язаних з цим патологій, які, в свою чергу, є етіологічними факторами формування метаболічного синдрому Х. В теперішній час експерти Всесвітньої організації охорони здоров'я відносять цей патологічний стан до "пандемії ХХІ ст.", оскільки він ідентифікований у 20...40 % населення планети.

В терапії ожиріння застосовують два препарати: орлістат та сібутрамін. Останній - це препарат центральної дії, що інгібує зворотний захват моноамінів. В 2010 р. його випуск призупинено, оскільки він сприяв розвитку серцево-судинних захворювань. Орлістат, що є інгібітором панкреатичної ліпази, отримують гідруванням ліпстатину - продукту метаболізму мікроорганізму *Streptomyces toxytricini*. Проте більш перспективним є використання інгібіторів ферментів рослинного походження, оскільки вони характеризуються низьким алергізуючим потенціалом, відсутністю токсичності та ефекту звикання.

Відомий спосіб одержання біологічно активної добавки (БАД) на основі рослинної сировини (пшеничні висівки - матриця та фенольні сполуки насіння ріпаку - інгібітор ліпази), яка має антиліполітичну дію (див. патент на корисну модель UA № 35846), що передбачає екстрагування насіння ріпаку (*Brassica napus* var. *Oleifera* D.C.), подрібнене на вальцювому млині до частинок діаметром 0,7-0,9 мм, у системі розчинників хлороформ-етанол в об'ємному співвідношенні (1,5-2,5):1,0 протягом 35 хв., проведення екстракції в таких умовах тричі, об'єднання витягів, випарювання при 40 °С під вакуумом 480 мм рт. ст. до повного видалення розчинника, розчинення 10 г комплексу фенольних сполук насіння ріпаку та 0,05 г кверцетину в 270 см³ дистильованої води, додавання одержаної водної суспензії до 89,95 г пшеничних висівок та перемішування до утворення гомогенної маси, висушування отриманої маси в сушильній шафі при температурі 40 °С до постійної маси.

Даний спосіб вибрано прототипом.

Прототип і спосіб, що заявляється, мають наступні спільні ознаки (операції):

- отримання фенольних сполук з насіння ріпаку;
- просочування біополімерної матриці водним розчином фенольних сполук;
- сушіння.

Але спосіб за прототипом має ряд суттєвих недоліків:

- низька антиліполітична активність препарату;
- обмежені захисні властивості матриці, що призводить до втрати близько 60 % антиліполітичної активності препарату після його експозиції в модельних умовах шлунково-кишкового тракту;
- наявність фосфоліпідів у складі розчину фенольних сполук ріпаку заважає ефективній іммобілізації інгібітора ліпази на біополімерну матрицю;
- відсутність у біополімерній матриці антиоксидантних властивостей, яке зумовлює необхідність введення до складу препарату антиоксиданту - кверцетину, що підвищує собівартість продукту.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб одержання дієтичної добавки з антиліполітичною активністю, в якому шляхом зміни порядку отримання інгібітора ліпази - фенольних сполук ріпаку - та заміни біополімерної матриці забезпечити одержання готового продукту, який проявляє антиліполітичну активність на високому рівні та не втрачає своїх властивостей після впливу на нього агресивного середовища шлунково-кишкового тракту, що дозволяє підвищити ефективність його дії та знизити добову дозу препарату.

Поставлена задача вирішена в способі одержання дієтичної добавки з антиліполітичною дією, що передбачає одержання фенольних сполук з насіння ріпаку, обробку біополімерного комплексу водним розчином фенольних сполук і сушіння, тим, що, на відміну від прототипу, насіння ріпаку подрібнюють, знежирюють гексаном і висушують до повного вилучення розчинника, а висушену масу піддають 2-4-кратному екстрагуванню 90-96 %-вим етанолом з центрифугуванням, супернатанти об'єднують і випаровують до повного вилучення розчинника, після чого подрібнені печериці заливають 0,9-1,1 %-вим розчином гідроксиду натрію і витримують при 75-80 °С протягом 30-60 хв. і гідромодулі (1-2), одержану суміш центрифугують, до осаду, що утворився, додають 6,9-7,1 %-вий водний розчин гідроксиду натрію, витримують 255-265 хв. при 95-98 °С і гідромодулі (1-2), суміш центрифугують, осад, що утворився, промивають водою до нейтрального значення рН промивних вод і центрифугують, а отриманий

таким чином біополімерний комплекс висушують, змішують з водним розчином отриманих фенольних сполук при співвідношенні фенольні сполуки: біополімерний комплекс (9,5-11,5):(88,5-90,5), витримують при температурі 20-25 °C протягом 20-30 хв. і висушують до постійної маси.

5 Насіння ріпаку подрібнюють до розміру часток 0,7-0,9 мм.

Знежирення подрібненого насіння ріпаку здійснюють гексаном в апараті Сокслета при співвідношенні подрібнене насіння ріпаку: гексан 1,0:(1,5-2,5) протягом 6,0-7,0 годин.

10 Екстрагування етанолом здійснюють при співвідношенні висушена маса обробленого насіння ріпаку: етанол рівному 10,0:1,0 при кімнатній температурі при перемішуванні протягом 10-15 хв.

Заявнику невідомі способи одержання препаратів, що містять іммобілізований інгібітор ліпази, антиліполітична активність якого перевищує антиліполітичну активність власне інтактного інгібітора ліпази.

15 Принциповою відмінністю винаходу, що заявляється, є те, що як інгібітор ліпази використовують фенольні сполуки ріпаку, в складі яких відсутні фосфоліпіди, та біополімерний комплекс печериці двоспорової (*Agaricus bisporus*). Використання як матриці біополімерного комплексу печериці двоспорової призводить до активізації антиліполітичної дії інгібітора ліпази за рахунок його синергітичної взаємодії з меланінами матриці, а здатність біополімерного комплексу проявляти антацидні властивості нівелює негативний вплив агресивного середовища шлунково-кишкового тракту на препарат, що, в свою чергу, дозволяє зберегти його антиліполітичну активність на високому рівні. Завдяки здатності біополімерної матриці проявляти антиоксидантну активність на високому рівні не виникає потреби в додатковому введенні до складу антиоксиданту - кверцетину. Застосування фенольних сполук ріпаку, позбавлених фосфоліпідів як супутніх речовин, приводить до підвищення ефективності процесу іммобілізації.

25 Спосіб здійснюють наступним чином.

Насіння ріпаку подрібнюють до частинок розміром 0,7-0,9 мм, знежирюють в апараті Сокслета гексаном в об'ємному співвідношенні (1,5-2,5):1,0 протягом 6,0-7,0 год., отриману масу висушують при температурі 38-42 °C під вакуумом 480 мм рт. ст. до повного вилучення розчинника. Подрібнену масу 2-4-кратно екстрагують 90-96 %-вим етанолом у об'ємному співвідношенні 10,0:1,0 та кімнатній температурі при перемішуванні протягом 10-15 хв., отриману суміш центрифугують при 6000 об./хв. протягом 15 хв. для відділення осаду від супернатанту. Одержані супернатанти об'єднують, випаровують при температурі 38-42 °C під вакуумом 480 мм рт. ст. до повного вилучення розчинника. Попередньо зважені і подрібнені некондиційні печериці заливають 0,9-1,1 %-вим розчином гідроксиду натрію і витримують при 35 75-80 °C протягом 30-60 хв. і гідромодулі (1-2) періодично перемішуючи, одержану суміш центрифугують при 6000 об./хв. протягом 15 хв. для відділення осаду від супернатанту. До осаду, що утворився, додають 6,9-7,1 %-вий розчин гідроксиду натрію, витримують 255-265 хв. при 95-98 °C і гідромодулі (1-2), суміш центрифугують при 6000 об./хв. протягом 15 хв. для відділення осаду від супернатанту. Осад промивають водою до нейтрального значення рН промивних вод і центрифугують при 6000 об./хв. 15 хв., висушують та подрібнюють до часток розміром 500 мкм. До 88,5-90,5 г осаду додають суспензію 9,5-11,5 г фенольних сполук, які розчиняють в 60 см³ дистильованої води, та перемішують до утворення гомогенної маси. Отриману масу витримують при температурі 20-25 °C протягом 20-30 хв. і далі висушують в сушильній шафі при температурі 40 °C до постійної маси.

45 Одержана дієтична добавка з антиліполітичною активністю являє собою дрібний порошок коричневого кольору.

Приклади здійснення способу.

Приклад 1

50 Насіння ріпаку подрібнюють до частинок розміром 0,7 мм, знежирюють в апараті Сокслета гексаном в об'ємному співвідношенні 1,5:1,0 протягом 6,0 год., отриману масу висушують при температурі 38 °C під вакуумом 480 мм рт. ст. до повного вилучення розчинника. Подрібнену масу двократно екстрагують 90 %-вим етанолом у об'ємному співвідношенні 10,0:1,0 та кімнатній температурі при перемішуванні протягом 10 хв., отриману суміш центрифугують при 55 6000 об./хв. протягом 15 хв. для відділення осаду від супернатанту. Одержані супернатанти об'єднують, випаровують при температурі 38 °C під вакуумом 480 мм рт. ст. до повного вилучення розчинника.

60 Подрібнені печериці заливають 1,1 %-вим розчином гідроксиду натрію, гідромодуль 1, витримують при 75 °C протягом 30 хв. періодично перемішуючи, одержану суміш центрифугують при 6000 об./хв. протягом 15 хв. для відділення осаду від супернатанту. До

осаду, що утворився, додають 6,9 %-вий розчин гідроксиду натрію, гідромодуль 1, витримують 255 хв. при 95 °С, суміш центрифугують при 6000 об./хв. протягом 15 хв. для відділення осаду від супернатанту. Осад промивають водою до нейтрального значення рН промивних вод і центрифугують при 6000 об./хв. 15 хв., висушують та подрібнюють до часток розміром 500 мкм.

- 5 До 90,5 г осаду додають суспензію 9,5 г фенольних сполук, які розчиняють в 60 см дистильованій воді, та перемішують до утворення гомогенної маси. Отриману масу витримують при температурі 20 °С протягом 25 хв. і далі висушують в сушильній шафі при температурі 40 °С до постійної маси.

Приклад 2

- 10 Насіння ріпаку подрібнюють до частинок розміром 0,8 мм, знежирюють в апараті Сокслета гексаном в об'ємному співвідношенні 2,0:1,0 протягом 6,5 год., отриману масу висушують при температурі 40 °С під вакуумом 480 мм рт. ст. до повного вилучення розчинника. Одержану масу трикратно екстрагують 96 %-вим етанолом у об'ємному співвідношенні 10,0:1,0 та кімнатній температурі при перемішуванні протягом 15 хв., отриману суміш центрифугують при 6000 об./хв. протягом 15 хв. для відділення осаду від супернатанту. Одержані супернатанти об'єднують, випаровують при 40 °С під вакуумом 480 мм рт. ст. до повного вилучення розчинника.

- 20 Подрібнені печериці заливають 1,0 %-вим розчином гідроксиду натрію, гідромодуль 2, витримують при 80 °С протягом 60 хв. періодично перемішуючи, одержану суміш центрифугують при 6000 об./хв. протягом 15 хв. для відділення осаду від супернатанту. До осаду, що утворився, додають 7,0 %-вий розчин гідроксиду натрію, гідромодуль 2, витримують 260 хв. при 98 °С, суміш центрифугують при 6000 об./хв. протягом 15 хв. для відділення осаду від супернатанту. Осад промивають водою до нейтрального значення рН промивних вод і центрифугують при 6000 об./хв. 15 хв., висушують та подрібнюють до часток розміром 500 мкм.

- 25 До 89,5 г осаду додають суспензію 10,5 г фенольних сполук, які розчиняють в 60 см³ дистильованої води та перемішують до утворення гомогенної маси. Отриману масу витримують при температурі 25 °С протягом 20 хв. і далі висушують в сушильній шафі при температурі 40 °С до постійної маси.

Приклад 3

- 30 Насіння ріпаку подрібнюють до частинок розміром 0,9 мм, знежирюють в апараті Сокслета гексаном в об'ємному співвідношенні 2,5:1,0 протягом 7,0 год., отриману масу висушують при температурі 42 °С під вакуумом 480 мм рт. ст. до повного вилучення розчинника. Одержану масу чотирикратно екстрагують 90 %-вим етанолом у об'ємному співвідношенні 10,0:1,0 та кімнатній температурі при перемішуванні протягом 15 хв., отриману суміш центрифугують при 6000 об./хв. протягом 15 хв. для відділення осаду від супернатанту. Одержані супернатанти об'єднують, випаровують при температурі 42 °С під вакуумом 480 мм рт. ст. до повного вилучення розчинника.

- 40 Подрібнені печериці заливають 0,9 %-вим розчином гідроксиду натрію, гідромодуль 1, витримують при 75 °С протягом 60 хв. періодично перемішуючи, одержану суміш центрифугують при 6000 об./хв. протягом 15 хв. для відділення осаду від супернатанту. До осаду, що утворився, додають 7,1 %-вого розчину гідроксиду натрію, гідромодуль 2, витримують 265 хв. при 98 °С, суміш центрифугують при 6000 об./хв. протягом 15 хв. для відділення осаду від супернатанту. Осад промивають водою до нейтрального значення рН промивних вод і центрифугують при 6000 об./хв. 15 хв., висушують та подрібнюють до часток розміром 500 мкм.

- 45 До 88,5 г біополімерного комплексу печериці додають суспензію 11,5 г фенольних сполук, які розчиняють в 60 см³ дистильованої води, та перемішують до утворення гомогенної маси. Отриману масу витримують при температурі 25 °С протягом 30 хв. і далі висушують в сушильній шафі при температурі 40 °С до постійної маси.

- 50 Вихід інгібітора ліпази залежить від кратності обробок подрібненої знежиреної маси насіння ріпаку і варіює в межах 87,2-96,7 %.

Хімічний склад дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, та їхню інгібіторну активність, значення якої виражено у відсотковому співвідношенні до вихідної активності інтактного інгібітора, наведено у табл. 1. За зразок порівняння було вибрано біологічно активну добавку, одержану за прототипом.

- 55 Умови отримання дієтичних добавок підбирали експериментально. Для цього встановлювали вплив масового співвідношення носій:інгібітор, температуру і тривалість процесу на антиліполітичну активність отриманих дієтичних добавок. З цією метою була отримана низка дієтичних добавок за наступними прикладами.

Приклад 4

Підготовку компонентів проводять згідно з прикладом 2. 8,5 г фенольних сполук насіння ріпаку розчиняють в 60 см³ дистильованої води, Одержаною водною суспензією просочують 91,5 г біополімерного комплексу печериці двоспорової. Наступні операції здійснюються згідно з прикладом 2.

5 Приклад 5

Підготовку компонентів проводять згідно з прикладом 2. 9,0 г фенольних сполук насіння ріпаку розчиняють в 60 см³ дистильованої води. Одержаною водною суспензією просочують 91,0 г біополімерного комплексу печериці двоспорової. Наступні операції здійснюються згідно з прикладом 2.

10 Приклад 6

Підготовку компонентів проводять згідно з прикладом 2. 12,0 г фенольних сполук насіння ріпаку розчиняють в 60 см³ дистильованої води. Одержаною водною суспензією просочують 88,0 г біополімерного комплексу печериці двоспорової. Наступні операції здійснюють згідно з прикладом 2.

15 Приклад 7

Підготовку компонентів проводять згідно з прикладом 2. 12,5 г фенольних сполук насіння ріпаку розчиняють в 60 см³ дистильованої води. Одержаною водною суспензією просочують 87,5 г біополімерного комплексу печериці двоспорової. Наступні операції здійснюються згідно з прикладом 2.

20 Приклад 8

Підготовку компонентів проводять згідно з прикладом 2. Отриману масу витримують при температурі 15 °С протягом 20 хв. і далі висушують в сушильній шафі при температурі 40 °С до постійної маси.

Приклад 9

25 Підготовку компонентів проводять згідно з прикладом 2. Отриману масу витримують при температурі 20 °С протягом 20 хв. і далі висушують в сушильній шафі при температурі 40 °С до постійної маси.

Приклад 10

30 Підготовку компонентів проводять згідно з прикладом 2. Отриману масу витримують при температурі 25 °С протягом 20 хв. і далі висушують в сушильній шафі при температурі 40 °С до постійної маси.

Приклад 11

35 Підготовку компонентів проводять згідно з прикладом 2. Отриману масу витримують при температурі 30 °С протягом 20 хв. і далі висушують в сушильній шафі при температурі 40 °С до постійної маси.

Приклад 12

Підготовку компонентів проводять згідно з прикладом 2. Отриману масу витримують при температурі 25 °С протягом 10 хв. і далі висушують в сушильній шафі при температурі 40 °С до постійної маси.

40 Приклад 13

Підготовку компонентів проводять згідно з прикладом 2. Отриману масу витримують при температурі 25 °С протягом 20 хв. і далі висушують в сушильній шафі при температурі 40 °С до постійної маси.

Приклад 14

45 Підготовку компонентів проводять згідно з прикладом 2. Отриману масу витримують при температурі 25 °С протягом 30 хв. і далі висушують в сушильній шафі при температурі 40 °С до постійної маси.

Приклад 15

50 Підготовку компонентів проводять згідно з прикладом 2. Отриману масу витримують при температурі 25 °С протягом 40 хв. і далі висушують в сушильній шафі при температурі 40 °С до постійної маси.

Хімічний склад дієтичних добавок, одержаних за прикладами 3-7, та їхню інгібіторну активність наведено у табл. 1. Умови отримання, хімічний склад дієтичних добавок, одержаних за прикладами 8-14, та їхню антиліполітичну активність наведено у табл. 2.

55 Встановлено, що антиліполітична активність дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-3, перевищує таку інтактного інгібітора та біологічно активної добавки, одержаної за прототипом. Значення інгібіторної активності останньої складає 80,1 % від інгібіторної активності інтактного інгібітора. Збільшення масової частки інгібітора до 12,5 % в складі дієтичних добавок, отриманих за прикладами 4-5, не сприяє істотній зміні величини цього показника. При зменшенні кількості інгібітора в складі дієтичних добавок спостерігається значне

зниження антиліполітичної активності зразків. Так, інгібіторна активність дієтичних добавок, одержаних за прикладами 6-7, в 1,1-1,5 разу менше за таку дієтичних добавок, отриманих за прикладами 1-3.

Таким чином, незважаючи на те, що власне матриця - біополімерний комплекс - не проявляє антиліполітичну активність, в результаті іммобілізації певної кількості інгібітора антиліполітична активність отриманого зразка перевищує таку інтактного інгібітора. Це обумовлено тим, що іммобілізація інгібітора відбувається не тільки за рахунок фізичної сорбції, але й завдяки взаємодії функціональних груп інгібітора та носія, що підтверджується даними ІЧ-спектроскопії. Так, в диференційних ІЧ-спектрах порівняння іммобілізованого інгібітора відносно механічної суміші носія і інгібітора знайдено зниження інтенсивності смуг поглинання при 1648-1690 cm^{-1} та 2900-3400 cm^{-1} , що свідчить про утворення сильного водневого зв'язку між карбонільними групами і гідроксильними групами інгібітора та ОН-групами матриці. Оскільки до складу біополімерної матриці входять меланіни, які за хімічною будовою належать до класу конденсованих фенольних сполук, тобто характеризуються спорідненістю з інгібітором ліпази, який являє собою суміш низько- та високомолекулярних фенольних сполук, можна припустити, що комплекс інгібітор-матриця утворюється переважно за рахунок взаємодії функціональних груп цих сполук. Ймовірно, саме спорідненість меланінів з фенольними сполуками інгібітора пояснює синергетичний ефект, який спостерігається при отриманні дієтичних добавок за способом, що заявляється, оскільки при іммобілізації інгібітора на біополімерному носії, що не містить меланіни, таке явище не спостерігалось. Проте не можна виключити ймовірність взаємодії функціональних груп інгібітора ліпази з гідроксильними групами полісахаридів, які входять до складу біополімерної матриці.

Як видно з даних, наведених в табл. 2, процес іммобілізації залежить не тільки від масового співвідношення інгібітор:носій, але й від температури та тривалості процесу. Встановлено, що найкращими показниками антиліполітичної активності характеризуються ті зразки, де процес іммобілізації проводять при температурі 20-25 °C протягом 20-30 хв. (приклади №№ 9, 10, 13, 14).

Оскільки в середовищі шлунково-кишкового тракту значна частина біологічно активних речовин зазнає різноманітних перетворень, що, в свою чергу, призводить до втрати їхньої активності, моделювали поведінку дієтичних добавок, одержаних за прикладом 2, та біологічно активної добавки, отриманої за прототипом, в умовах травлення (табл. 3 та 4).

Встановлено, що після інкубації в середовищі шлункового соку дієтична добавка, одержана за прикладом 2, характеризується високим рівнем збереження антиліполітичної активності. Подальша її експозиція в жовчі призводить до зниження величини даного показника до 113,1 %. За цих же умов залишкова інгібіторна активність біологічно активної добавки, отриманої за прототипом, в 3,5 рази нижче в порівнянні з дієтичною добавкою, одержаною за прикладом 2.

Відомо, що в процесі зберігання дієтичних добавок природного походження можуть відбуватися різноманітні біохімічні процеси, які призводять до зміни функціонально-фізіологічних властивостей. В зв'язку з цим були проведені дослідження зміни антиліполітичної активності дієтичних добавок, одержаних за прикладом 2 та біологічно активної добавки, отриманої за прототипом, протягом восьми місяців зберігання.

Аналіз результатів досліджень, наведених в табл. 5, свідчить, що дієтична добавка, отримана за прикладом 2, навіть без додаткового введення антиоксиданту характеризується більш високим ступенем збереження антиліполітичної активності, ніж дієтична добавка, отримана за прототипом. Так, після восьми місяців зберігання інгібіторна активність дієтичної добавки, одержаної за прикладом 2, в 1,9 разу вище, ніж біологічно активної добавки, отриманої за прототипом.

Ефективність дії отриманих дієтичних добавок досліджували в умовах *in vivo* на білих щурах-самцях, у яких викликали гіперліпідемію шляхом перерольного введення висококалорійної добавки, яка містить 2,50 % холестеролу, 0,12 % метилурацилу та 30,00 % рослинної олії, що попередньо прогріли за високою температурою та охолодили. Добова доза дієтичної добавки складала 135 мг/кг. Тварин утримували на загальному раціоні з вільним доступом до води та їжі згідно з вимогами, викладеними в книзі "Лабораторні тварини в медико-біологічних експериментах" //В.П. Пішак, В.Г. Висоцька, В.М. Магальс та ін. - Чернівці: Мед університет, 2006. - 350 с.

Експериментальні дослідження проводили відповідно до вимог біоетики згідно з національними "Загальними етичними принципами експериментів на тваринах", що викладені в "Загальних етичних принципах експериментів на тваринах" (документ, розроблений робочою групою Конгресу під керівництвом чл.-кор. НАН і АМН України О.Г. Резнікова) //Ендокринологія. - 2003. - Т. 8. - № 1. - С. 142-145, які узгоджуються з положеннями "European convention for the

protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes" - Council of Europe, Strasbourg, 1986. -53 p.

Досліджували такі показники: морфометричні - вивчення динаміки зміни маси тіла тварин протягом експерименту (зважування тварин проводили до і після закінчення експерименту); копрологічні дослідження - після виведення тварин з експерименту проводили мікроскопію водної суспензії кала; біохімічні - після виведення тварин з експерименту в сироватці крові визначали показники ліпідного обміну - загальні ліпіди, холестерин, тригліцериди, а також активність ферментів, що характеризують функціональний стан гепатобіліарної системи: аланін- і аспартатамінотрансферази (АЛТ і АСТ).

Тварини були розділені наступним чином: 1 група - контрольна, що отримувала загальний раціон харчування; 2 група - тварини, що перорально отримували дієтичну добавку, одержану за прикладом 2; 3 група - тварини, що отримували висококалорійну добавку, тобто отримували висококалорійний раціон; 4 група - тварини, що отримували дієтичну добавку і висококалорійний раціон.

Результати досліджень наведено в табл. 6-8.

У групі, що перорально отримувала дієтичну добавку, яка одержана за прикладом 2, відмічено незначне зниження приросту маси тіла тварин в порівнянні з контрольною групою. Надходження до організму тварин висококалорійного раціону підвищувало показники приросту маси тіла в даній групі на 49,3 % відносно до контрольної групи тварин. У групі, що перорально одержувала дієтичну і висококалорійний раціон, відмічено зниження приросту маси тіла на 33,6 % в порівнянні з тваринами, які отримували тільки висококалорійний раціон (табл. 6).

При копрологічних дослідженнях проводили мікроскопію водної суспензії калу тварин з додаванням барвника Судану III, який дозволяє виявити в калі нейтральний жир і продукти його розщеплення. Результати мікроскопії оцінювали наступним чином:

в полі зору:

нейтральний жир відсутній; залишки жирової їжі виділяються переважно у вигляді мила - "норма";

1-5 зерен нейтрального жиру; 2-4 голок жирних кислот - "+";

5-10 зерен нейтрального жиру; 5-10 голок жирних кислот - "++";

більше 10 зерен нейтрального жиру; більше 10 голок жирних кислот, розташованих радіально, віночком - "+++".

Копрологічні дослідження підтвердили результати, отримані при оцінці маси тіла шурів. Так, в калових масах інтактних тварин і в групі, що отримувала висококалорійний раціон, не виявлено нейтральний жир і жирні кислоти. Це вказує на нормальне функціонування травної системи і відсутність недостатності ліполітичної активності кишечника (табл. 7).

При введенні тваринам дієтичної добавки на фоні отримання висококалорійного раціону спостерігається 10 і більше зерен жиру в полі зору, рідко зустрічалися також тонкі голки жирних кислот. Це вказує на пригнічення процесу ліполізу і надходження з верхніх відділів кишечника в калові маси нерозщепленого жиру.

Встановлено, що прийом дієтичної добавки майже не впливає на рівень загальних ліпідів у крові тварин (табл. 8). Отримання висококалорійного раціону підвищує їх вміст на 39,7 % по відношенню до контролю, а одночасне надходження в організм дієтичної добавки і висококалорійного раціону достовірно знижує вміст загальних ліпідів на 27,6 % в порівнянні з групою, що отримувала висококалорійний раціон. Отримання висококалорійного раціону протягом місяця достовірно збільшувало вміст тригліцеридів в крові в 2,4 рази. Одночасний прийом дієтичної добавки і висококалорійного раціону достовірно знижує вміст тригліцеридів на 38,7 % по відношенню до групи, що одержувала висококалорійний раціон. Достовірне підвищення на 50,9 % рівня холестерину виявлено у тварин, експонованих висококалорійним раціоном, а в групі, що одержувала одночасно дієтичну добавку і висококалорійний раціон, відмічено достовірне зниження даного показника на 29,0 % відносно до групи, що одержувала висококалорійний раціон.

Після виведення тварин з експерименту в сироватці крові вивчали активність амінотрансфераз (АСТ і АЛТ) та їх співвідношення, які є маркерним показником функціонального стану гепатобіліарної системи, і є основним органом, де відбуваються процеси анаболізму і катаболізму ліпідів.

Підвищена активність АЛТ виявлена в групі тварин, що отримувала висококалорійний раціон - ріст на 40,0 %, при цьому коефіцієнт де Рітіса - відношення АСТ/АЛТ - зменшився на 13,2 %. У групі, що одержувала одночасно висококалорійний раціон і дієтичну добавку, АСТ і АЛТ знаходилися на рівні значень контрольної групи.

Таким чином, введення в раціон харчування щурам дієтичної добавки протягом 1-го місяця позитивно впливало на показники морфометрії. Відзначено достовірне підвищення маси тіла у тварин, які отримували протягом місяця висококалорійний раціон, а також позитивна динаміка стабілізації маси у тварин, які отримували одночасно висококалорійний раціон і дієтичну добавку. Прийом дієтичної добавки суттєво не впливав на рівень вмісту загальних ліпідів, тригліцеридів і холестерину в крові тварин, відзначено лише тенденцію до їх зниження. Моделювання гіперліпідемії у тварин викликало значне підвищення цих показників у крові, що свідчить про розвиток гіпертригліцеридемії, гіперхолестеринемії та ліпідозу. Одночасне надходження в організм висококалорійного раціону і дієтичної добавки достовірно знижує вміст загальних ліпідів, тригліцеридів і холестерину відносно до групи, що одержувала тільки висококалорійний раціон. Введення в раціон тварин дієтичної добавки не викликало зміну показників АЛТ і АСТ, що може характеризувати стабільність функціонування основних метаболічних систем і підтверджувати безпеку застосування препарату. Підвищену активність АЛТ виявлено тільки в групі тварин, що отримувала висококалорійний раціон. У групі, що одержувала одночасно дієтичну добавку і висококалорійний раціон, спостерігалася стабілізація даних показників. Здатність дієтичної добавки, одержаної за прикладом 2, впливати на ліпідний обмін, а саме інгібувати розщеплення жирів в кишечнику, підтверджено наявністю неперетравлюваних нейтральних жирів в калі тварин групи, що отримувала одночасно висококалорійний раціон і дієтичну добавку. За цих же умов в калі тварин групи, що отримувала висококалорійний раціон, відсутні зерна жиру, що свідчить про повне засвоєння жирів організмом тварин, і як наслідок, розвиток ожиріння.

Таким чином, рівень антиліполітичної активності дієтичних добавок, одержаних за способом, що заявляється, на відміну від дієтичної добавки, одержаної за прототипом, перевищує таку інтактного інгібітора, вони є більш стійкими до інактивуючої дії середовища шлунково-кишкового тракту та характеризуються більш високими показниками антиліполітичної активності, навіть після восьми місяців зберігання. В дослідях *in vivo* підтверджено ефективність застосування дієтичних добавок при надлишковому надходженні до організму ліпідів як засобів, що попереджують розвиток гіперліпідемії та ожиріння.

Таблиця 1

Хімічний склад дієтичних добавок, одержаних за прикладами 1-7, та їхня інгібіторна активність

№ прикладу	Вміст компонентів, %		Інгібіторна активність, % від активності інтактного інгібітору
	Фенольні сполуки ріпаку, %	Біополімерний комплекс, %	
1	9,5	90,5	129,1
2	10,5	89,5	132,9
3	11,5	88,5	136,4
4	12,0	88,0	137,0
5	12,5	87,5	137,4
6	8,5	91,5	91,3
7	9,0	91,0	112,4

Таблиця 2

Вплив умов отримання на
інгібіторну активність дієтичних добавок, одержаних за прикладами 8-15

№ прикладу	Вміст компонентів, %		Температура проведення процесу іммобілізації, °C	Тривалість проведення процесу іммобілізації, хв.	Інгібіторна активність, % від активності інтактного інгібітора
	Фенольні сполуки ріпаку, %	Біополімерний комплекс, %			
8	10,5	89,5	15	20	128,3
9	10,5	89,5	20	20	133,1
10	10,5	89,5	25	20	133,4
11	10,5	89,5	30	20	131,3
12	10,5	89,5	25	10	127,4
13	10,5	89,5	25	20	132,8
14	10,5	89,5	25	30	133,7
15	10,5	89,5	25	40	133,1

Таблиця 3

Збереження інгібіторної активності дієтичної добавки, одержаної за прикладом 2, в умовах шлунково-кишкового тракту, % від активності інтактного інгібітора

Середовище	Тривалість інкубації, год.			
	0	1	2	3
Шлунковий сік	132,9	132,4	130,6	120,7
Жовч	120,7	117,9	114,6	113,1

Таблиця 4

Збереження інгібіторної активності біологічно активної добавки, одержаної за прототипом, в умовах шлунково-кишкового тракту, % від активності інтактного інгібітора

Середовище	Тривалість інкубації, год.			
	0	1	2	3
Шлунковий сік	80,1	79,4	78,8	73,7
Жовч	79,7	60,1	44,9	32,4

Таблиця 5

Збереження інгібіторної активності дієтичної добавки, одержаної за прикладом 2, та біологічно активної добавки, отриманої за прототипом, при зберіганні

Тривалість зберігання, міс.	Інгібіторна активність, % від активності інтактного інгібітора	
	Дієтична добавка, одержана за прикладом 2	Біологічно активна добавка, одержана за прототипом
0	132,9	80,1
2	131,2	78,6
4	129,6	76,9
6	126,4	75,4
8	125,3	66,0

Таблиця 6

Динаміка зміни маси тіла тварин при проведенні експерименту

Група	Середня маса тварини до експерименту	Середня маса тварини після експерименту
1	214,7	248,2
2	216,1	240,4
3	215,8	268,8
4	217,4	250,6

Таблиця 7

Вплив дієтичної добавки, одержаної за прикладом 2, на вміст жиру в калових масах тварин

Група	Вміст жиру в калових масах, кількість "+"	
	До експерименту	Після експерименту
1	-	-
2	-	0,4
3	-	-
4	-	2,1

Таблиця 8

Результати дослідження впливу дієтичної добавки на деякі біохімічні показники тварин

Показник	Група			
	1	2	3	4
Загальні ліпіди, г/л	4,66	4,52	6,81	4,93
Тригліцериди, г/л	0,72	0,68	1,73	1,06
Холестерин, ммоль/л	1,12	1,01	1,69	1,20
АСТ, од/хв.	66,72	60,57	81,11	63,24
АЛТ, од/хв.	25,92	26,84	36,29	27,18

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб одержання дієтичної добавки з антиліполітичною дією, що передбачає одержання фенольних сполук з насіння ріпаку, обробку біополімерного комплексу водним розчином фенольних сполук і сушіння, який **відрізняється** тим, що насіння ріпаку подрібнюють, знежирюють гексаном і висушують до повного вилучення розчинника, а висушену масу піддають 2-4-кратному екстрагуванню 90-96 % етанолом з центрифугуванням, супернатанти об'єднують і випаровують до повного вилучення розчинника, після чого подрібнені печериці заливають 0,9-1,1 % розчином гідроксиду натрію і витримують при 75-80 °С протягом 30-60 хв і гідромодулі 1-2, одержану суміш центрифугують, до осаду, що утворився, додають 6,9-7,1 % водний розчин гідроксиду натрію, витримують 255-265 хв при 95-98 °С і гідромодулі 1-2, суміш центрифугують, осад, що утворився, промивають водою до нейтрального значення рН промивних вод і центрифугують, а отриманий таким чином біополімерний комплекс висушують, змішують з водним розчином отриманих фенольних сполук при співвідношенні фенольні сполуки:біополімерний комплекс (9,5-11,5):(88,5-90,5), витримують при температурі 20-25 °С протягом 20-30 хв і висушують до постійної маси.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що насіння ріпаку подрібнюють до розміру часток 0,7-0,9 мм.
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що знежирення подрібненого насіння ріпаку гексаном здійснюють в апараті Сокслета при співвідношенні подрібнене насіння ріпаку: гексан 1:(1,5-2,5) протягом 6,0-7,0 годин.
4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що екстрагування етанолом здійснюють при співвідношенні висушена маса обробленого насіння ріпаку:етанол рівному 10,0:1,0 при кімнатній температурі при перемішуванні протягом 10-15 хв.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601