

Изобретение относится к фармацевтической и парфюмерно-косметической промышленности. Комплекс липидов, полученный заявляемым способом, может быть использован как компонент, способствующий регенерации клеток эпителия.

Известны способы получения липидов и их комплексов путем экстракции органическими растворителями из различных источников сырья.

Наиболее близким к заявляемому по технической сущности является способ получения комплекса липидов "Тимихол" из животного сырья.

Этот способ предусматривает получение комплекса липидов из вилочковой железы КРС с применением двух органических растворителей.

Сырье после измельчения гомогенизируют в физиологическом растворе, центрифугируют, флотирующую фракцию супернатанта экстрагируют изопропанолом, дополнительно центрифугируют и осадок, содержащий целевой продукт, растворяют в гексане.

Экстракцию супернатанта изопропанолом и растворение осадка в гексане проводят в соотношении 1 : 5 - 10.

Полученный по способу-прототипу комплекс содержит, мас. %:

Глицериды 30,0 - 45,0

Глицерофосфаты (фосфолипиды) 40,0 - 70,0

Холестерин (в свободном и этерифицированном состоянии) 1,5 - 4,0

Неомыляемые вещества 3,0 - 5,0

Жирные насыщенные кислоты в массовом отношении к ненасыщенным составляют 2 : 1.

К недостаткам прототипа следует отнести получение липидного комплекса в две стадии. Кроме того, полученный комплекс имеет жидкую консистенцию, что обусловлено большим содержанием фосфолипидов (до 70%), чем глицеридов (30%). Такая консистенция менее приемлема для использования в качестве жировой основы в косметических кремах и лечебных мазях.

В основу изобретения поставлена задача разработать способ получения биологически активного липидного комплекса из вилочковой железы крупного рогатого скота (КРС), позволяющий путем проведения экстракции липидов из флотирующей фракции гексаном в одну стадию получить фракцию с большим содержанием жира, упростить технологию и расширить спектр биологического действия получаемого липидного комплекса.

Для этого в способе получения биологически активного комплекса липидов, включающем измельчение вилочковой железы КРС, гомогенизацию ее в водном растворе, центрифугирование с выделением флотирующей фракции и экстракцию липидов органическим растворителем, жировую фракцию, полученную на стадии центрифугирования, экстрагируют в одну стадию гексаном в соотношении 1 : 5 - 7 и из гексанового раствора липидов после концентрации и фильтрации получают липидный комплекс.

Полученный комплекс липидов содержит следующие компоненты в мас. %:

Глицериды 40 - 50

Глицерофосфатиды (фосфалипиды) 40 - 50

Жирные кислоты 5 - 10

Неомыляемые вещества 2 - 9

Холестерин 1 - 4

Массовое соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот 2,5 : 1,0.

В табл.1 приведен состав фосфолипидов, входящих в липидные комплексы, полученные по заявляемому способу и по способу-прототипу.

Состав комплекса, полученный заявляемым способом, обогащен фосфатидилхолином, за счет чего усиливаются его эмульгирующие свойства и обеспечивается нужная для кремов и мазей консистенция.

Заявляемый способ исключает экстракцию липидов изопропанолом, что упрощает процесс, а проведение экстракции гексаном позволяет обогатить комплекс глицеридами и фосфолипидами, ненасыщенными жирными кислотами, что способствует улучшению эмульгирующих свойств комплекса и расширяет спектр его биологического действия.

Синергетическое действие триглицеридов, фосфолипидов и жирных кислот обеспечивает противовоспалительное, смягчающее и регенерирующее действие полученного комплекса, что подтверждается испытаниями его биологической активности.

Способ осуществляют следующим образом.

Пример 1. 10кг вилочковой железы измельчают на мясорубке, гомогенизируют в 20л физиологического раствора, центрифугируют 30мин при 3000об/мин и температуре 4°C. Полученную флотирующую фракцию липидов (верхний слой в центрифужном стакане) собирают для дальнейшей очистки. Осадок может быть использован для выделения препарата ДНК, а супернатант - для производства препарата типа "Вилозен". Липидную фракцию повторно центрифугируют 15мин при 3000об/мин для максимального удаления влаги. После центрифугирования 3,5кг липидов загружают в стеклянный реактор и заливают гексаном в соотношении 1 : 5, т.е. 17,5л гексана. Экстракцию липидов проводят при 40°C и перемешивании в течение 2ч. После отделения гексанового раствора липидов его концентрируют вакуумной отгонкой, фильтруют и сушат до получения целевого продукта.

Примеры 2 и 3. Операции осуществляются в той же последовательности, изменяется только соотношение липидной фракции и гексана и температура экстракции.

В табл.2 приведены условия осуществления способа (примеры 1, 2, 3), а в табл.3 - составы полученных липидных комплексов.

В табл.4 приводятся данные по заживлению нарушений эпителия кожи при бритье после обработки комплексом, полученным по заявляемому способу и по способу-прототипу.

Противовоспалительное действие комплекса, полученного заявляемым способом, иллюстрируется табл.5.

На объем лапки животного наносится 0,1мл 1% - ного раствора формалина, который уже через 1ч вызывает увеличение объема лапки. Затем на лапку наносят липидный комплекс, и через определенное время объем лапки восстанавливается до первоначального.

Как видно из табл.5, противовоспалительное действие комплекса проявляется уже через 1ч у 3 опытных животных из 5, а через 3ч восстанавливается первоначальный объем лапки, т.е. полностью устраняется воспалительная реакция кожи, вызванная действием формалина.

Изучение влияния комплекса, полученного заявляемым способом, и комплекса, полученного по способу-прототипу, на процессы репаративной регенерации проводили на 21 белой крысе обоего пола массой 200 - 230г.

У крыс на спине деэпилировали участок кожи. Спустя 3 дня под эфирным наркозом иссекали участок кожи с подкожной клетчаткой размером  $2 \times 2$  см ( $400\text{мм}^2$ ). Крысы были распределены на 3 группы по 7 в каждой. Одна группа служила контролем, вторая и третья получали наружно соответственно комплексы, полученные заявляемым способом и способом-прототипом, путем нанесения на раневую поверхность 1 раз в день. На 10, 15, 20 день лечения проводили измерения площадей ран. Был определен средний срок полного закрытия раны и процент ускорения заживления по отношению к контрольной группе животных, не получавших лечения.

Результаты ранозаживляющей активности липидных комплексов приведены в табл.6.

Как видно из табл.6, комплекс, полученный по заявляемому способу, ускоряет заживление плоской раны кожи крыс на 30% в сравнении с контролем. Таким образом, этот комплекс стимулирует регенерацию не только эпителиальных клеток кожи, но и клеток мягких тканей.

В настоящее время вилочковая железа КРС используется нерентабельно, исключительно как сырье для белковых иммунокорректирующих препаратов типа "Вилозен" и для выделения суммарной ДНК. В процессе производства этих препаратов липидный компонент анализируется.

Заявляемый способ позволяет наряду с получением указанных препаратов использовать флотирующую фракцию для получения биологически активного липидного комплекса.

Т а б л и ц а 1

Фосфолипиды	В комплексе, полученном по заявляемому способу	В комплексе, полученном по способу-прототипу
Фосфатидилхолин	60	45
Фосфатидилэтаноламин	30	45
Офингомиелин	7	5
Фосфатидилинозитол	3	5

Т а б л и ц а 2

Условия	Пример 1	Пример 2	Пример 3
Липидную фракцию смешивают с гексаном в соотношении	1:5	1:7	1:5
Время экстракции, ч	2	02	2
Температура, °С	40	50	69
Выход целевого продукта по отношению к весу липидной фракции	25	35	30

Т а б л и ц а 3

Состав	Пример 1	Пример 2	Пример 3
Глицериды	40	40	50
Глицерофосфатиды (фосфолипиды) С	42	45	40
вободные жирные кислоты	8	8	5
Неомыляемые вещества	6	5	4
Холестерин	4	2	1

Т а б л и ц а 4

Комплексы липидов вилочковой железы	Количество полных циклов обработки нарушений эпителия кожи (цикл обработки после бритья 2-3 с, выдержка 15-20 с										Эффект действия
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
По способу- прототипу	*	*	*	*	*	*					Процесс заживления небольших нарушений эпителия кожи после 6 циклов
По заявляемому способу	*	*	*	*							Процесс заживления небольших нарушений эпителия кожи после 4 циклов

Т а б л и ц а 5

Исходный объем лапки	Объем лапки через период времени после нанесения 0,1 мл 1%-ного формалина			Объем лапки через период времени после нанесения комплекса, полученного заявляемым способом		
	1 ч	2 ч	3 ч	1 ч	2 ч	3 ч
3,0	3,2	3,3	3,4			
3,2	3,5	3,6	3,7			
3,1	3,3	3,3	3,5			
3,3	3,4	3,5	3,6			
3,3	3,4	3,4	3,7			
3,0	3,2			3,1	3,1	3,0
3,1	3,3			3,2	3,1	3,1
3,2	3,4			3,4	3,2	3,2
3,0	3,2			3,2	3,1	3,0
3,2	3,5			3,4	3,3	3,2

Т а б л и ц а 6

Комплексы липидов	Площадь раны, мм <sup>2</sup> , по дням наблюдения			Средний срок полного закрытия раны, сут.	Ускорение заживления, % к контролю
	10-й	15-й	20-й		
Контроль	166±9	65±8	36±7	25,0±0,5	—
Комплекс, полу- ченный заявля- емым способом	64±4	42±4	Закрытие раны	17,5±0,5	30,0
Комплекс, полу- ченный по спосо- бу-прототипу	55±4	36±5	Закрытие раны	17,6±0,5	29,6